

1955

M. J. Coulon - Morelos

Paris 1955

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

pour l'obtention du diplôme de
Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement
le 6 juin 1955 par :

Marie-Josèphe COULON-MORELLEC
Assistante à l'Institut Pasteur

ISOLEMENT ET ETUDE DE LA CONSTITUTION
D'UN ACIDE GLYCERO-INOSITO-PHOSPHATIDIQUE
EXTRAIT DU GERME DE BLE

Jury	{	M. FLEURY	Président
		M. COURTOIS	Assesseurs.
		M. GERMAN	



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS.

ADMINISTRATION

MM. RENE FABRE ... Doyen, C. *, I.
 R. DELABY Assesseur, O. *, I.
 G. CUVIER Secrétaire Général, I.
 L. JEANDIL ... Secrétaire, I.
 E. BUVAT Commis, I.
 A. QUILLOT ... Rédacteur.
 Melle M. DENNY Rédactrice.
 Mme M.L. ESPINASSE Rédactrice, A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, C. *, I. Toxicologie.
 DELABY, O. *, I. Pharmacie chimique.
 FLEURY, *, I. Chimie biologique.
 PICON, O. *, I. Chimie minérale.
 MASCRE, O. *, I. Botanique.
 JANOT, *, I. Pharmacie galénique.
 CHARONNAT, *, I. Chimie organique.
 VALETTE, *, I. Pharmacodynamie.
 BEDEL, *, I. Législation, Déontologie et
 Histoire de la pharmacie.
 PARIS, *, A. Histoire naturelle des Médica-
 ments simples d'origine végétale
 GUILLOT, *, A. Physique.
 GAUTIER, *, I. Chimie analytique.
 LAMBIN, (Melle), *, I. Microbiologie.
 RAOUL, *, A. Zoologie appliquée.
 DOMANGE, *, I. Professeur à titre personnel.
 COURTOIS, *, A. Professeur à titre personnel.
 CRETE, *, A. Professeur à titre personnel.
 CAVIER, *, A. Professeur sans chaire.
 MORETTE, *, I. Professeur sans chaire.
 TRUHAUT, *, I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS C. *, I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, C. *, I. et
 LEBEAU, C. *, I.

membres de l'Institut

BOUGAULT, C. *, I.
 HERISSEY, C. *, I.
 LAUNOY, O. *, I.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553823_0040

MAITRES DE CONFERENCES

MM. MOREAU,  A	Sciences physiques et chimiques.
GUY	Sciences physiques et chimiques.
GERMAN,  A	Sciences naturelles.
PIETTE,  A	Sciences naturelles.
QUEVAUVILLER,  A	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES.

MM. CORRIEZ,  I.	Physique.
HARISPE,  A	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON	Botanique.
GIRARD,  A	Chimie biologique.
MANGEOT,  A	T. P. 4 ^{ème} année.
RENAULT H.  A	Chimie analytique.
DESVIGNES	Microbiologie.
BORY	Sérologie.
N	Biologie animale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. COUTAREL,  A	Pharmacotechnie galénique.
WAROLIN	Pharmacotechnie chimique.
N	Pharmacodynamie.

BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER,   I.

Bibliothécaires : Melle. LAVAUD,  I., Mme KREHLER.

A MON MARI

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Qu'il nous permette de la remercier de ses conseils précieux et de son accueil toujours bienveillant.

A Monsieur le Professeur J. COURTOIS

A Monsieur GERMAN

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie

qui ont bien voulu faire partie du Jury de cette thèse, en témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

A Monsieur le Docteur AUBLANT

Secrétaire général de l'Institut Pasteur

Nous exprimons notre gratitude à la
Direction de l'Institut Pasteur qui
nous a fait l'honneur de nous admettre
dans les cadres de cette maison à la-
quelle nous sommes fière d'appartenir.

A Mademoiselle M. FAURE

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

qui a inspiré et dirigé constamment
cette thèse. Nous n'oublierons jamais
avec quelle patience et quel dévouement
elle nous a appris à travailler et a su
nous faire goûter la joie de la recher-
che. Nous sommes heureuse de lui témoi-
gner ici notre reconnaissance et notre
attachement.

A Monsieur PERGELINE, Chef de Service aux
Grands Moulins de Paris, qui nous a obligeamment
fourni la matière première pour la réalisation de
ce travail et que nous tenons à remercier ici.

A mes Amis

ISOLEMENT ET ETUDE DE LA CONSTITUTION
D' UN ACIDE GLYCERO - INOSITO - PHOSPHATIDIQUE
EXTRAIT DU GERME DE BLE

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :	
<u>LES INOSITOPHOSPHATIDES</u>	3
I - Inositophosphatides microbiens	5
II - Inositophosphatides végétaux	6
III - Inositophosphatides d'origine animale	8
<u>LES ACIDES PHOSPHATIDIQUES</u>	
I - Définition	10
II - Acides phosphatidiques végétaux et leur origine enzymatique	10
III - Acides phosphatidiques d'origine animale	12
<u>LES LIPIDES DU GRAIN DE BLE</u>	
I - Répartition des lipides dans le grain de blé - leur composition et leur taux de concentration	14
II - Acides phosphatidiques du germe de blé	17
III - Enzymes susceptibles d'agir sur les acides phos- phatidiques	18
PARTIE EXPERIMENTALE :	
<u>TECHNIQUES UTILISEES</u>	20
Dosages	21

PREPARATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

I - La matière première	24
II - L'extraction, la séparation et la purification des acides phosphatidiques	25

FRACTIONNEMENT DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

I - Fractionnement et purification des acides phosphatidiques	29
II - Composition des fractions " S " et " I "	35
III - Tentatives de purification de la fraction " I "	36
IV - Isolement par cristallisation	40
V - Propriétés sérologiques de la fraction " S " et des cristaux	42

ETUDE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DU PHOSPHATIDE CRISTALLISE

I - Hydrolyse du phosphatide cristallisé	42
II - Identification de la fraction - Soluble dans l'alcool-éther-	45
III - Identification de la fraction - Insoluble dans l'alcool éther-	47
IV - Etude des acides gras ??????.....	49

STRUCTURE DE LA MOLECULE

I - Etude des produits de l'hydrolyse ménagée du phosphatide	53
II - Oxydation périodique du phosphatide	56

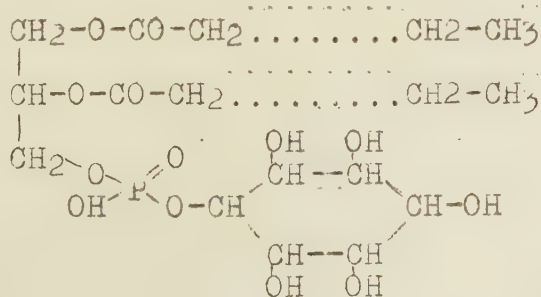
R E S U M E	68
-------------------	----

B I B L I O G R A P H I E	72
---------------------------------	----

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le germe de blé est un produit particulièrement riche en acides phosphatidiques et certains de ces phosphatides possèdent l'intéressante propriété sérologique de pouvoir être utilisés comme antigène de Wassermann dans le sérodiagnostic de la syphilis. Ces faits nous ayant incités à entreprendre l'étude de ces lipides, nous avons isolé, au cours de nos recherches, un acide phosphatidique renfermant de l'inositol dont l'étude fait l'objet du travail exposé ici. Nous avons pu obtenir ce composé à l'état de sel de sodium cristallisé, fait rare dans le domaine des phosphatides. L'analyse nous a montré que la molécule de cet acide phosphatidique est constituée par 2 acides gras, 1 glycérol, 1 inositol et 1 acide phosphorique dont une seule fonction acide est libre; c'est pourquoi nous avons proposé le terme d'acide glycéro-inosito-phosphatidique pour désigner ce nouveau type de composé. Enfin, l'étude des produits résultant de l'action de l'acide périodique sur ce phosphatide nous a permis d'en préciser la structure que l'on peut schématiser par la formule suivante :



Avant d'exposer nos recherches personnelles, nous avons cru bon de résumer brièvement nos connaissances sur l'ensemble des inositophosphatides et des acides phosphatidiques actuellement connus ainsi que sur les lipides du grain de blé et de son germe, notre matière première.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

E T U D E B I B L I O G R A P H I Q U E

=====

LES INOSITO-PHOSPHATIDES

Par ce terme, nous désignons les lipides phosphorés renfermant, dans leur molécule, de l'inositol.

La présence d'inositol dans les phosphatides a été décelée tout d'abord dans les bacilles tuberculeux - 1930 (1). Par la suite, on a caractérisé ce polyol dans de nombreux lipides phosphorés d'origine végétale et animale : soja 1939 (25), cerveau 1942 (17), foie 1947 (28), arachide, maïs et blé 1950 (23) (33), lin 1951 (26), organes animaux divers 1953 (27), muscle cardiaque 1954 (13).

Selon leur origine, ces inositophosphatides présentent des constitutions différentes. Ils renferment tous des acides gras et du glycérol mais l'inositol est estérifié, soit par une, soit par deux molécules d'acide phosphorique. La molécule lipidique peut contenir, en outre, un cation minéral (calcium, magnésium, potassium), une base azotée (éthanolamine, sérine), des oses (arabiose, galactose, mannose ...), un acide organique (acide d-tartrique).

Ces divers inositophosphatides ont des propriétés communes. Ils sont solubles dans le chloroforme, le benzène l'éther de pétrole et l'éther hydratés; ils sont insolubles dans l'acétone, le méthanol et l'éthanol. Dans l'eau, ils donnent des émulsions stables.

Lorsqu'on fractionne l'ensemble des phosphatides à l'aide

d'alcool, on obtient, suivant l'ancienne nomenclature, la fraction " lécithine " soluble dans l'alcool et la fraction " céphaline " insoluble dans l'alcool. Les inositophosphatides se trouvent toujours dans la fraction " céphaline " où ils accompagnent la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine.

Pour préparer les inositophosphatides, les divers auteurs utilisent fréquemment la technique de Folch (18) : précipitations fractionnées et répétées de la solution chloroformique concentrée des phosphatides par de l'éthanol ou du méthanol. Les fractions les moins solubles dans l'alcool renferment les inositophosphatides ; on les émulsionne dans de l'eau et on les soumet à une dialyse de façon à éliminer les substances non lipidiques (phosphates, oses, bases azotées ...) qui les souillent. Les produits ainsi obtenus ne sont pas purs; ils sont souillés, en particulier, par de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylsérine entraînées par les phénomènes de solubilisations réciproques. Dans la majorité des cas, les auteurs ont analysé ces mélanges hétérogènes et, de ce fait, il est difficile de connaître la composition exacte et la structure de l'inositophosphatide proprement dit.

LES INOSITOPHOSPHATIDES MICROBIENS.

=====

C'est dans les phosphatides du bacille tuberculeux humain qu'Anderson a découvert la présence d'inositol (1). Par la suite, il a étendu cette constatation à d'autres bacilles acidorésistants : bacilles tuberculeux bovin, aviaire, bacille de Timothy, bacille lépreux (?) (2) (3) (4) (5). Ces phosphatides ont une composition complexe - ils renferment également du glycérol et des oses - et cette composition diffère suivant les souches et même suivant les lots de bacilles examinés. Anderson a étudié la constitution de ces phosphatides en les soumettant à des hydrolyses ménagées diverses : alcalines ou acides, à froid ou à chaud. Dans le cas du bacille tuberculeux humain, on peut obtenir, selon les modalités, l'inositol sous différentes formes : inositol libre, acide inositomonophosphorique, acide glycéro-inositodiphosphorique, acide manninositosephosphorique, mann~~an~~ositolose (glucoside non réducteur constitué de 2 mannose et 1 inositol). Les hydrolysats renferment également de l'acide glycérophosphorique, de l'acide mannosephosphorique, de l'acide mannoseglycérodiphosphorique et d'autres produits complexes non identifiés, phosphorés ou non, et renfermant du mannose et d'autres oses. De tous ces résultats, il est difficile de déduire la constitution du ou des inositophosphatides présents car les produits analysés sont constitués par le mélange de plusieurs types de phosphatides.

Les phosphatides du bacille tuberculeux sont doués d'une

propriété sérologique spécifique : ils fixent le complément en présence de sérum antituberculeux. M. Faure (10) a soumis l'ensemble des phosphatides à des fractionnements répétés afin de tenter d'isoler l'haptène responsable de cette activité biologique. Alors que la fraction des acides glycérophosphatidiques simples ne contenant ni inositol ni ose est dénuée d'activité, cette dernière se concentre dans une fraction riche en inositol et pauvre en ose. Il est probable que l'haptène lipidique du bacille tuberculeux soit un inositophosphatide mais, le produit obtenu étant impur, il n'est pas possible d'affirmer la chose.

LES INOSITOPHOSPHATIDES VEGETAUX.

=====

En 1939, Klenk et Sakaï (25) ont obtenu, à partir des phosphatides bruts du soja, un phospholipide à inositol. Ils ont identifié, dans l'hydrolysât de la fraction "céphaline", de l'acide inositomonophosphorique et de l'acide glycérophosphorique. Ceci leur a fait supposer que, dans le produit phosphatidique initial, l'acide inositomonophosphorique est lié à des acides gras mais ils n'ont pu isoler un tel phosphatide.

En 1942-43, Woolley (37) a déterminé la structure partielle d'une préparation extraite du soja et qu'il a dénommée "lipositol". Cette substance qui renferme du monophosphate d'inositol et des proportions presque équimoléculaires d'acides gras saturés et d'acide oléique paraît être, cependant, un mélange assez peu défini, riche en galactose et en acide d-tartrique.



En 1947, Folch (19) a isolé, aussi, la fraction phosphatide à inositol des graines du soja. Il s'agit d'un sel mixte de Ca, Mg et K qui lui a fourni, dans les produits d'hydrolyse, les proportions suivantes de constituants : amine 1, inositol 2, galactose 2, glycérol 2, acide phosphorique 2, acides gras 3.

Hawthorne et Chargaff (1954) (22) ont caractérisé, dans les produits de l'hydrolyse ménagée des inositolphosphatides du soja, outre un monophosphate d'inositol, un mélange d'esters de l'acide phosphorique qui sont probablement le galactoside et l'arabinoside du monophosphate d'inositol.

Les graines du coton fournissent, également, des phospholipides qui ressemblent au "lipositol" du soja (Olcott, 1944) (30).

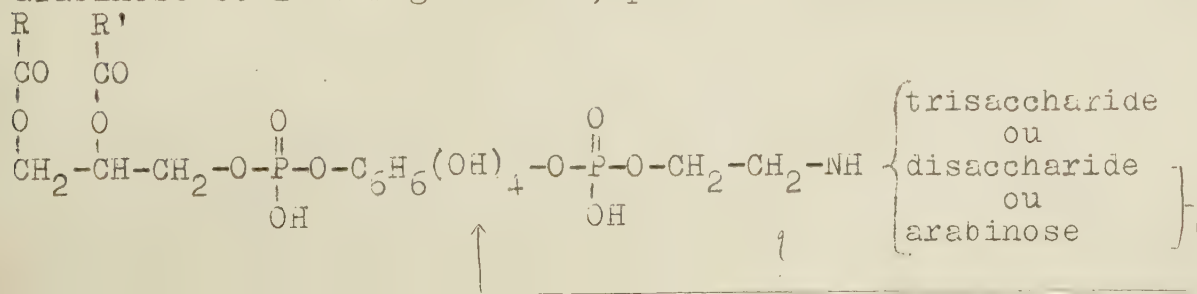
En 1948 puis en 1950, Schofield et ses collaborateurs (32) (33) ont isolé une fraction inositolphosphatidique des lipides du soja et du maïs. Par l'emploi de la technique "distribution à contre-courant hexane-méthanol", ils ont pu mettre en évidence deux types majeurs de phosphoinositides. Ceux du soja ont des rapports P/N et P/inositol voisins de 2 et le sucre ne semble pas être un constituant de la molécule. Les inositides du maïs se scindent en un phosphatide, plus soluble dans l'hexane, possédant 1 P, 1 N et 1 sucre et en un phosphatide, plus soluble dans le méthanol, dont le rapport P/N est supérieur à 1.

En 1951, Mc Guire et Earle (26) ont étudié et fractionné les phospholipides des graines du lin. Par l'emploi de la technique "distribution à contre-courant hexane-éthanol",

ils ont obtenu deux types de phosphoinositiques : ceux contenus dans la phase alcoolique qui ont un rapport P/N/inositol égal à 2/1/1 et ceux, plus solubles dans l'hexane, qui ont un rapport P/N/inositol égal à 4/4/1; les sucres passent dans toutes les fractions mais leur mode de combinaison, s'il existe, n'a pas été déterminé.

En 1950, Hutt, Malkin, Poole et collaborateurs (23) ont établi la structure de la "Céphaline" de l'arachide. Ils considèrent cette substance comme étant un mélange de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylsérine combinés, chacun, avec un galacto-arabinoside ou avec l'inositol ou peut-être avec les deux. Puisque la moitié de l'azote total est présente comme amine libre, le sucre peut être relié au groupement aminé et l'inositol au phosphore.

Et récemment (1953), Malkin et Poole (29) ont isolé, à l'état pur, la portion phosphatidique de l'arachide qui contient de l'inositol (la chromatographie sur papier leur permettant de suivre la composition des fractions obtenues). Ce phosphatide a un rapport N/P voisin de 2; il renferme des proportions équimoléculaires d'acide palmitique et d'acide oléique et, dans ses produits d'hydrolyse, on trouve 1 molécule d'acide glycérophosphorique pour 1 molécule d'acide inositolphosphorique. Les auteurs ont proposé de représenter la molécule du phosphatide, qui contient, entre autres, 2 molécules de L-arabinose et 1 de D-galactose, par la formule suivante :



et ils cherchent à obtenir l'inositol diphosphate pour pouvoir préciser cette structure.

LES INOSITOPHOSPHATIDES D'ORIGINE ANIMALE.

C'est surtout à partir du cerveau, source particulièrement riche en inositol, que furent isolés les inositophosphatides d'origine animale.

En 1942, Folch et Woolley (17) ont repris leurs produits de fractionnement de la "céphaline" du cerveau de boeuf et ont isolé, des fractions les plus solubles dans l'alcool : phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine, et, de la fraction la moins soluble : de l'acide glycerophosphorique et de l'inositol.

Burmester (1946) (6) a obtenu, à partir de la "céphaline" cérébrale de veau, un phospholipide à inositol purifié qu'il rapproche de celui de Folch mais qui paraît être différent de celui obtenu par Rathmann à partir de la "céphaline" de porc. Ce phospholipide à inositol présente une similitude avec la β -céphaline.

En 1949, Folch (20) a repris l'étude de ces composés et a pu isoler, de cerveau de boeuf, un diphosphoinositide riche en inositol. Il a déterminé, par oxydation périodique, la structure du métadiphosphate d'inositol. Ce diphosphoinositide semble exister, naturellement, sous forme de sel de Ca et Mg renfermant des proportions équimoléculaires de métadiphosphate d'inositol, de glycérol et d'acides gras, mais le mode de liaison du glycérol et des acides gras au diphosphate d'inositol reste, cependant, à déterminer.

En 1947, Macpherson et Lucas (28) et, en 1952, Mc Kibbin

et Wanda E. Taylor (27) ont décelé la présence de phosphatides à inositol dans leurs produits de fractionnement des lipides du foie. Ils en ont entrepris l'étude, mais nous manquons de précisions sur l'état actuel de leurs recherches.

Récemment, alors que le présent travail était encore en cours, nous avons pu isoler, du muscle cardiaque de boeuf, un phosphatide cristallisé qui s'est révélé être un acide glycéro-inosito-phosphatidique analogue à celui que nous avons isolé du germe de blé (13).

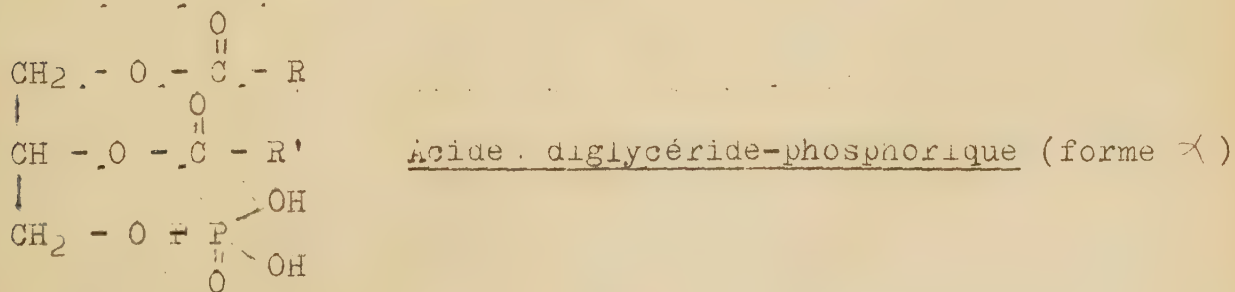
LES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

DEFINITION.

Nous désignons par ce terme des lipides phosphorés ne renfermant pas d'azote et possédant une ou plusieurs fonctions acides libres.

ACIDES PHOSPHATIDIQUES VÉGÉTAUX ET LEUR ORIGINE ENZYMATIQUE.

Les acides phosphatidiques furent isolés, pour la première fois, par Chibnall et Channon en 1929 (8), d'un extrait étheré de feuilles de chou. Après avoir décelé la présence de phosphore et, par là-même, la présence possible de phosphatides dans cet extrait étheré, ils le fractionnèrent par un grand excès d'acétone; de la fraction la plus insoluble dans l'acétone bouillante, ils séparèrent un sel de calcium brut qui, purifié et soumis à l'analyse, se révéla être le sel de calcium d'un acide diglycérade-phosphorique. Ces auteurs ont pu établir la formule du nouveau composé isolé et identifier les acides gras qui estérifient deux des fonctions alcool du glycérol :



Les acides gras de ce composé, contrairement à ceux des glycé-

rides d'origine animale, donnent par fractionnement une plus grande proportion d'acides non saturés : acides linoléique, linolénique et peut-être oléique, que d'acides saturés : acides stéarique et palmitique.

L'acide diglycéride phosphorique isolé des feuilles de chou ranferme, toutefois, 0,25 p.100 d'azote qui n'a pu être éliminé et qui ne paraît pas être dû à la présence d'un peu de lécithine ou de céphaline.

Etant donné les caractères de solubilité différents des phosphatides de calcium et de sodium, on a suggéré le rôle possible de l'acide phosphatidique dans la perméabilité cellulaire.

Ces phosphatides de calcium ou de magnesium ont été mis également en évidence, dans les feuilles d'épinard mais ils s'y trouvent en proportion moindre, et dans le *Dactylis glomerata* - Smith, Chibnall (1932) (34) -

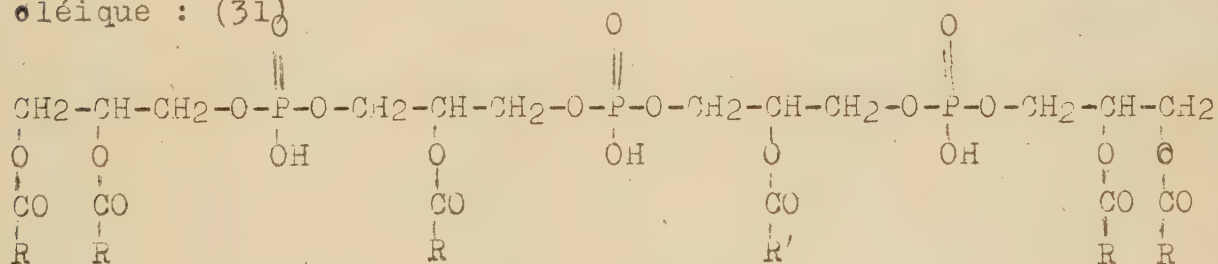
Comme nous le verrons plus loin, le germe de blé est riche en acides phosphatidiques.

Certains auteurs ont cherché à préciser l'origine des acides phosphatidiques chez les végétaux. Pour Chibnall et Channon, ces substances seraient préformées dans la feuille et ne résulteraient pas de l'hydrolyse de glycérophosphatides. Mais plus récemment, en 1947-48, Hanahan et Chaikoff ont prouvé que les acides phosphatidiques des carottes et des feuilles de chou prenaient naissance lors du broyage de ces organes par action d'un enzyme détachant les bases azotées des phosphatides. L'enzyme responsable de ce clivage peut être inactivé par un

traitement préalable, à la vapeur par exemple, des matières premières choisies pour l'obtention de phosphatides; on obtient alors, non plus des acides phosphatidiques, mais des phosphatides azotés. (21)

ACIDES PHOSPHATIDIQUES D'ORIGINE ANIMALE.

En 1940-42, Miss Pangborn recherchant, dans un extrait alcoolique de coeur de boeuf, le support de l'activité antigénique de cet extrait vis à vis des sérums de patients syphilitiques, a obtenu, par une méthode de purification très poussée, une substance phosphatidique qu'elle dénomme "cardiolipin". Celle-ci serait un acide phosphatidique particulier, non azoté, et constitué par un acide tétra-glycéro-triphosphorique estérifié par 5 molécules d'acide linoléique et 1 molécule d'acide oléique : (31)



R-COOH = acide linoléique

R'-COOH = acide oléique

Appliquant à cet acide polyglycérophosphorique une méthode analytique différente de celle de Pangborn, nous avons été amenée à considérer le cardiolipide comme un acide phosphatidique triglycéro-diphosphorique (14). En associant le cardiolipide à de la lécithine et à du cholestérol, on peut préparer des divers antigènes utilisés pour effectuer le sérodiagnostic de la syphilis; cet acide phosphatidique complexe représente l'hap-

tène de Wassermann.

En 1952, Mc Kibbin et Wanda E. Taylor (27) ont soumis les lipides du foie de Chien à une méthode de fractionnement qui leur a permis d'isoler un nouveau composé, le polyglycérol-phosphatide. Ce mode de fractionnement, basé sur les caractères de solubilité et d'adsorption des composés lipidiques insolubles dans l'acétone, a séparé les phospholipides du foie en : -une fraction A ne renfermant pas de phosphatides à choline, mais riche en phosphatides à inositol, et contenant une grande proportion de phosphatides pas ou peu azotés et, également, un sphingolipide.
- et en fractions constituées par de plus grandes quantités de phosphatides à choline.

La partie de la fraction A, soluble dans le mélange toluène-méthanol, a subi elle-même un fractionnement chromatographique qui a permis, aux auteurs, de séparer le polyglycérol-phosphatide des lipides azotés contaminants et des phosphatides de composition différente; tous les éluats, cependant, renfermaient un "phosphatide à sérine ou à acide aminé".

Ce polyglycérol-phosphatide s'est dédoublé, par hydrolyse, en acide glycéro-phosphorique et en un ester phosphorique du glycérol combiné avec quelque substance inconnue. Il contient du glycérol, du phosphore et des acides gras de nature difficile à identifier, dans les proportions moléculaires suivantes : 3/2/3.

L'homogénéité de ce nouveau phosphatide isolé du foie de chien reste, cependant, à déterminer.

LES LIPIDES DU GRAIN DE BLE

REPARTITION DES LIPIDES DANS LE GRAIN DE BLE - LEUR COMPOSITION ET =====

LEUR TAUX DE CONCENTRATION.

=====

Avant d'aborder l'étude même des acides phosphatidiques du germe de blé, notons quelques données concernant la répartition des lipides dans le grain, leur composition et leur taux de concentration. Il est toutefois difficile de rapporter des résultats très rigoureux car les moyennes obtenues par les différents auteurs varient assez largement selon le type, la provenance et le degré de maturité des grains et, surtout, selon le protocole d'extraction et les solvants employés pour obtenir l'extrait lipidique. (*).

Jacobs et Rask établissaient la répartition suivante des lipides totaux du grain : la moitié se trouve dans le son comprenant la couche d'aleurone, les $\frac{2}{5}$ dans l'endosperme amylicé et 11 p.100 dans le germe.

Selon Zaharia, le grain de blé possède une teneur moyenne en lipides de 1,85 p.100 de la matière première sèche; cette teneur s'élève à 2,95 p.100 pour Sullivan et Near qui ont effectué l'analyse d'une collection de blés américains à l'état frais. Schulze, d'autre part, a pu déterminer la valeur de la fraction phosphatidique de ces lipides : exprimée

(*) - Ces données ont été relevées dans : Bailey. - The constituents of wheat and wheat products, Reinhold P; Corp., N.Y., 1944.

en lécithine, elle s'élève à 0,65 p.100 - Nottbohm indique une teneur en phosphatides de 1,25 p.100 -. Les valeurs du phosphore lipidique qui varient de 0,026 à 0,11 p.100 sont, toutefois, difficiles à interpréter puisque le phosphore du grain de blé est distribué entre la phytine, les nucléoprotéines, les phosphatides et les sels minéraux. En ce qui concerne la lécithine, Bernardini et Chiarulli, en 1909, mentionnent 0,14 p.100 de lécithine libre pour 0,30 p.100 de lécithine combinée; cette dernière ayant tendance à augmenter au cours de la germination. La présence de complexes phosphatidiques est déjà donc relevée à cette date.

Les données moyennes relatives à la composition des lipides des diverses parties du grain sont les suivantes :

- Pour les farines de type courant, les lipides extraits par Sullivan et Howe correspondent à 1,38 p.100 de la farine deséchée. Ces lipides renferment 4,1 p.100 d'insaponifiable dont la moitié est représentée par des stérols combinés : palmitate de sitostérol notamment. Barton et Wright ayant obtenu une teneur en lipides de 1,85 p.100 ont pu séparer, de ces lipides une fraction insoluble dans l'acétone (13,5 p.100 de la totalité des lipides) constituée par un mélange de phosphatides et de glycolipides. La valeur moyenne du phosphore lipidique est de 0,047 p.100 (Hanke, 1940). La farine renferme 5 fois moins de lécithine que le germe.

- Pour le son, les lipides extraits par Sullivan et Near représentent 6,5 p.100 du son à l'état frais. Barton et Wright ont obtenu 3,03 p.100 de lipides qui renferment 12,1 p.100 d'insaponifiable et qui leur ont fourni 9,1 p.100 de substances

insolubles dans l'acétone (phosphatides bruts). La teneur en phosphatides, du son, est de 0,50 p.100 (Geoffroy, 1934); valeur du phosphore lipidique : 0,028 p.100 (Bailey, 1932).

- Pour le germe, caractérisé par sa haute teneur en lipides totaux, ceux-ci représentent 13,6 p.100 des germes à l'état frais, selon Sullivan. Ces lipides, comme d'ailleurs ceux de la farine et du son, renferment des acides gras, des hydrates de carbone, de nombreux stérols, du phytostérol (0,44 p.100) et d'autres composés. Les acides gras sont constitués, en moyenne, par 84 p.100 d'acides **non** saturés (représentés par des quantités approximativement égales d'acides α et β linoléique et d'acide oléique et par une petite quantité d'acide linoléique et par 16 p.100 d'acides saturés dont les $3/4$, environ, sont représentés par de l'acide palmitique et le reste par de l'acide stéarique et un peu d'acide lignocérique. Barton et Wright obtiennent, à partir des germes de blé, 6,72 p.100 de lipides qui renferment 5,6 p.100 d'insaponifiable et 6,5 p.100 d'une fraction insoluble dans l'acétone. La teneur en phosphatides, des germes, est de 1,2 à 1,3 p.100 (Halden 1947).

Barton et Wright pensant que l'enveloppe du grain, fournissant le son, est plus riche en lécithine et céphaline que les autres parties du grain dans lesquelles il y a prédominance d'un sel de magnésium de lipides non azotés : les acides phosphatidiques.

En outre, les phosphatides sont présents dans le blé sous forme de combinaison avec les hydrates de carbone dont il est difficile de les libérer (Nottbohm et Mayer, 1934) et la haute teneur en phosphatides, du gluten, (8,5 à 11,1 p.100

d'après Sullivan et Near, 1928¹ semble indiquer, également, leur étroite association avec les protéines. C'est ainsi que, en 1936, Rewald notait "53 p.100 des phosphatides du blé sont combinés avec les hydrates de carbone et avec les protéines", et que en 1947, Högi identifiait le saccharose comme constituant d'un complexe - phosphatide/sucre - présent dans le germe de blé.

ACIDES PHOSPHATIDIQUES DU GERME DE BLE.

=====

Les acides phosphatidiques du germe de blé ont été plus particulièrement étudiés par Channon et Foster, en 1934, qui ont déterminé les meilleurs modes d'extraction du germe, et les conditions de fractionnement les plus favorables pour obtenir la fraction phosphatidique. Une analyse détaillée de cette fraction leur a permis d'en établir la composition. Celle-ci est la suivante : substances non phosphatidiques représentées, en majorité, par des hydrates de carbone, lécithine 36,4 p.100, céphaline 8 p.100, phosphatide de Mg 29 p.100, substances étrangères azotées et, enfin, insaponifiable, 6,2 p.100, dans lequel ont été identifiés différents stérols non phosphorés. Les acides phosphatidiques obtenus par ces auteurs constituent 42 p.100, au moins, des phosphatides totaux. (7)

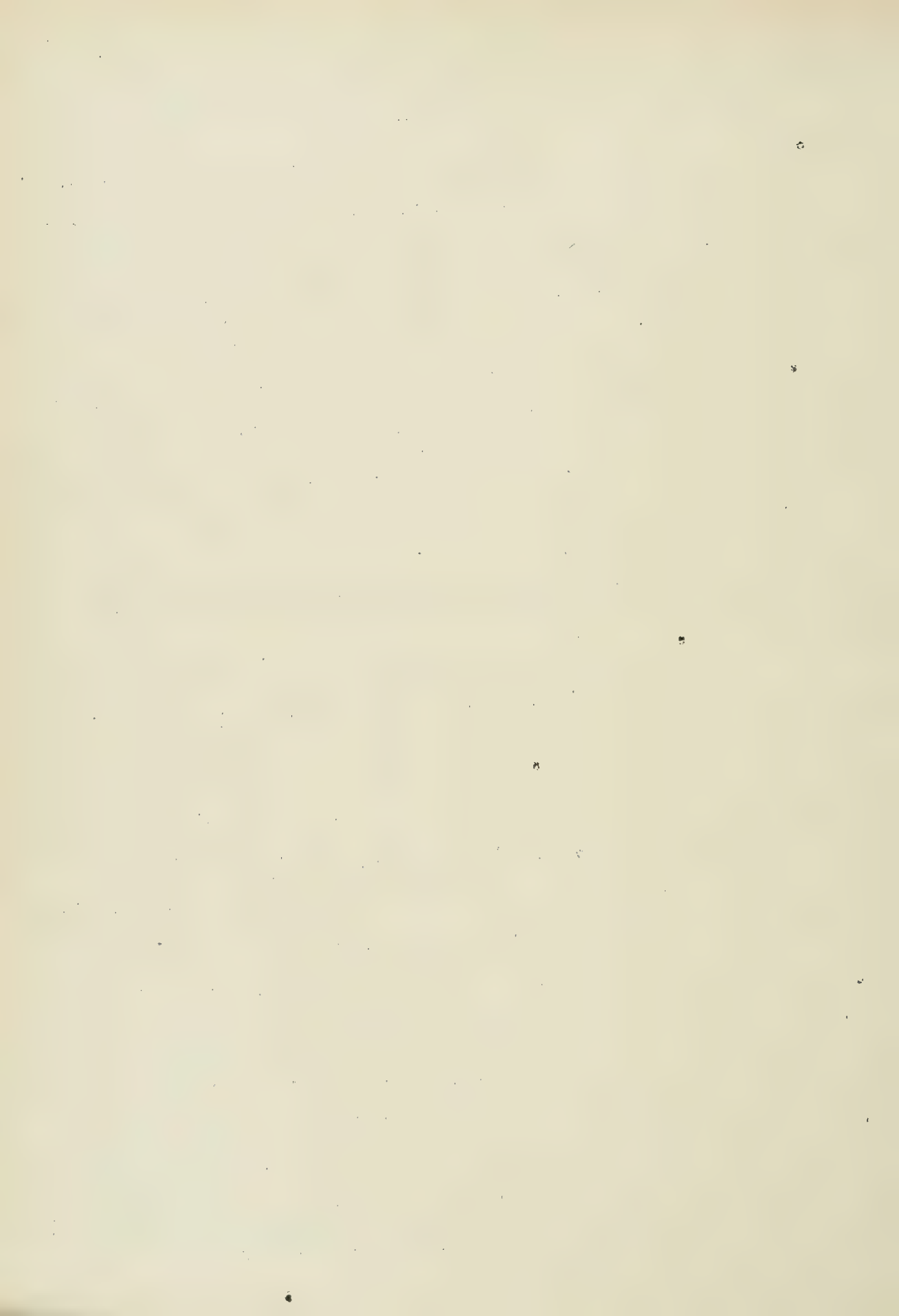
Plus récemment, en 1949, E. Uroma et Yuomioja (35) ont effectué, également, de nombreux travaux sur les acides phosphatidiques extraits de la poudre de germe de blé, mais leurs recherches sont surtout orientées vers l'obtention d'une substance qu'ils dénomment "Sitolipin" et qui, mélangée à du

cholestérol et de la lécithine en proportions déterminées, s'est révélée être un bon antigène syphilitique comme le cardiolipide.

En 1951, E. Uroma et Louhivori ont préparé et hautement purifié l'antigène "Sitolipin" par une méthode appropriée inspirée de celle utilisée par Miss Pangborn pour l'isolement du cardiolipide de coeurs de boeuf. La "Sitolipin" obtenue est un composé non azoté, renfermant 4,26 p.100 de phosphore et 50 p.100 d'acides gras non saturés qui expliquent son indice d'iode élevé et son caractère d'oxydabilité très poussé. Ces auteurs n'ont pas apporté de précisions sur sa structure mais ils la rapprochent de celle du cardiolipide. (36)

ENZYMES SUSCEPTIBLES D'AGIR SUR LES ACIDES PHOSPHATIDIQUES.

Les acides phosphatidiques existent donc dans le grain de blé mais il est peu probable que celui-ci en renferme une quantité déterminée car, d'une part, les acides phosphatidiques semblent résulter d'une action enzymatique sur des phosphatides azotés préexistants et, d'autre part, ces mêmes acides peuvent être dégradés en leurs constituants du fait de la présence d'estérases dans le grain de blé. Parmi ces estérases mises en évidence par Iono, en 1931, les lipases, qui libèrent en particulier les acides gras des glycérides, ont une activité notable, surtout au cours de la germination du grain et pour un degré d'humidité convenable. Elles ne sont pas concentrées dans les couches du son mais paraissent être présentes, en plus grande quantité, dans le scutellum et dans la couche d'aleurone. Le blé est, toutefois, en comparaison d'autres



plantes, une source pauvre en enzymes lipolytiques et il ne semble pas y avoir de parallélisme entre sa teneur en lipides et son activité lipolytique. D'autres estérases sont également présentes : les phosphatases, enzymes hydrolysant des esters variés d'acides oxyphosphoriques - la phytase hydrolyse l'acide phytique en inositol et acide phosphorique; une phosphodiesterase et deux phosphomonoestérases ont été décrites par Booth, en 1944, (l'une hydrolyse l' α -glycérophosphate plus rapidement que le β) - (*)

(*) - Ces données ont été relevées dans : Anderson J, Ansel.- Enzymes and their Role in wheat Technology, Interscience publishers inc. N. Y., 1946, p. 127-153.

PARTIE EXPERIMENTALE

TECHNIQUES UTILISEES

Afin d'alléger le texte de cet exposé, nous rassemblons, ici, les descriptions ou les indications des diverses techniques les plus couramment employées dans ce travail.

- Les solvants sont tous rectifiés avant d'être employés. L'alcool éthylique et l'alcool méthylique sont soumis à une rectification en présence de potasse en plaques. L'acétone est déshydratée par ébullition à reflux en présence de chlorure de calcium anhydre pendant 2 heures, au moins, puis elle est distillée sur du nouveau chlorure de calcium. L'éther est déshydraté et privé de peroxyde d'éthyle par distillation en présence de chlorure de calcium et chlorure stanneux; pour obtenir un produit rigoureusement anhydre, l'éther précédent est mis en contact avec du sodium et il est distillé extemporanément.
- Les solutions sont concentrées sous vide, à une température inférieure à 50°, dans des appareils entièrement en verre rodé. L'évaporation des parties aliquotes de solution est faite sous un jet de gaz carbonique ou d'azote pour éviter les oxydations au contact de l'air. Dans ce même but, les diverses fractions obtenues sont conservées soit en solution dans de l'alcool éthylique ou méthylique soit à l'état insoluble sous un solvant

stable : alcool, acétone. Les produits ne sont jamais maintenus en solution chloroformique ou éthérée pendant plus de 48 heures. Ils ne sont jamais conservés à l'état sec (sans solvant) même sous vide.

- Le poids des fractions décrites est déterminé par pesée d'une partie aliquote desséchée sous vide, à la température ordinaire, en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant.

DOSAGES

=====

Ne disposant le plus souvent que de petites quantités de produits nous avons dû faire appel, pour doser les éléments ou les composés obtenus au cours de ce travail, aux microméthodes suivantes :

- Les dosages de phosphore ont été effectués par la microméthode colorimétrique de Fiske et Subbarow, légèrement modifiée quant à la destruction de la matière organique. Cette méthode est basée sur le fait que l'acide phosphorique, libéré par destruction sulfo-nitrique de la matière organique, est transformé en acide phosphomolybdique que l'on réduit par de l'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique; l'intensité de la teinte bleue qui se développe est mesurée colorimétriquement. On peut doser, ainsi, de 10 à 50 γ de phosphore.

Ayant à effectuer de nombreux dosages de phosphore sur de faibles quantités de substance - 0,2 à 5 mg. de phosphatides ou de leurs produits d'hydrolyse - nous avons cherché à mettre au point une technique simple et très rapide



de destruction de la matière organique. Divers essais nous ont conduit à adopter le procédé suivant : la prise d'essai, déposée dans le fond d'un tube à essais jaugé à 10 cm³, est dissoute dans 0,2 cm³ d'acide sulfurique concentré que l'on chauffe doucement jusqu'à léger brunissement. On ajoute 1 goutte d'un mélange à parties égales d'acide nitrique et d'acide perchlorique et on chauffe à ébullition sur la veilleuse d'un bec bunsen, La décoloration et la destruction sont pratiquement instantanées; sinon, on ajoute à nouveau I à II gouttes du mélange nitro-perchlorique. on chauffe jusqu'à émission des vapeurs blanches de l'acide sulfurique (les vapeurs nitreuses formées sont chassées par un courant d'air). Le temps exigé par cette destruction est de 1 minute au maximum.

On effectue alors le dosage selon la technique de Fiske et Subbarow. Les volumes des réactifs sont réduits de façon à obtenir un volume final de 10 cm³ (description détaillée dans (15)).

Lors de nos essais, nous avons vérifié que des excès de I à X gouttes du mélange nitro-perchlorique ne troublaient pas les résultats. Par ailleurs, la destruction étant très rapide, il ne se forme pas d'acide pyrophosphorique; il est donc inutile de soumettre le produit de la destruction à une hydrolyse aqueuse avant de doser l'acide phosphorique.

- Les microdosages de l'azote ont été réalisés par la technique habituelle de Kjeldahl (24).

- Le baryum a été dosé pondéralement à l'état de sulfate
- Les déterminations d'indice d'iode des acides gras ont été faites par la micro-méthode de Rosenmund-Kuhnhen modifiée par Yasuda qui fait appel à la fixation de l'halogène sur les doubles liaisons par l'emploi d'un réactif à base de sulfate de dibromopyridine (11).

Ce dosage nécessite une prise d'essai de 20 mg., environ de phosphatides ou de 10 à 15 mg. d'acides gras selon leur degré d'insaturation.

- La micro-détermination du poids moléculaire des acides gras a été réalisée par un dosage direct de l'acidité de la solution alcoolique bouillante de l'acide gras par de la potasse alcoolique en présence de phtaléine. La solution de potasse alcoolique est titrée, dans les mêmes conditions, à l'aide d'acide stéarique et d'acide palmitique purs.

Nous avons opéré sur 20 mg., environ, de chaque acide gras à identifier que l'on dissout dans 10 cm³ d'alcool éthylique à 80° maintenu bouillant pendant toute la durée du dosage. La potasse est dissoute également dans 10 cm³ d'alcool éthylique de même titre de manière à obtenir une solution N/20 environ.

- Les dosages d'oses ont été effectués par la méthode de Fontès et Thivolle, adaptée au dosage des oses libérés par une hydrolyse acide (10).

PREPARATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

LA MATIERE PREMIERE.

Les germes de blé, que nous avons utilisés pour préparer l'acide glycéro-inosito-phosphatidique faisant l'objet de ce travail, nous ont été fournis directement par les Grands Moulins de Paris (*) et nous ne donnerons, ici, qu'un bref aperçu de leur fabrication.

Les grains de blé, dont le degré d'humidité varie selon leur type et, surtout, selon la saison de leur récolte, sont stockés pendant un, deux ou trois ans au maximum dans des silos bien aérés et étroitement surveillés pour éviter tout échauffement possible. Ils sont traités comme suit :

Les grains dépoussiérés, ébarbés et nettoyés sont amenés au degré d'humidité propice à une bonne mouture (15°5) en leur faisant subir tout d'abord un lavage, destiné entre autres à accroître le degré d'humidité des grains trop secs qui fourniraient une farine grise, puis en les essorant et en les soumettant à l'action d'un courant d'air alternativement chaud (40 à 50°) et froid. Ensuite, les grains sont moulus et les différents produits de mouture obtenus sont séparés par tamisage. La fraction la plus riche en germes est alors passée dans des claqueurs qui aplatissent ces germes (chaque petit disque formé étant ainsi constitué par un agrégat de plusieurs germes) et permettent leur séparation par calibrage et densité. C'est sous cette forme qu'ils sont délivrés dans le commerce à des

degrés variables de pureté. Ceux, dont nous avons extrait les acides phosphatidiques, étaient des germes n°1, c'est à dire, des germes très purs.

Bien que les grains de blé ayant fourni les germes aient été conservés pendant un certain temps avant d'être traités et qu'ils aient été soumis à une température modérée lors de leur séchage, il ne saurait y avoir eu destruction totale de leurs enzymes. Après l'écrasement des germes par les claqueurs il peut donc se manifester une activité enzymatique détachant, notamment, les bases des phosphatides azotés présents et donnant ainsi naissance aux acides phosphatidiques. D'autre part, comme nous l'avons vu au chapitre relatif à la constitution enzymatique des germes de blé, il peut se produire également, dans certaines conditions, une dégradation plus poussée des phosphatides. Cette dégradation se manifestant par la destruction des fonctions esters il y aurait, ainsi, libération d'acides gras et d'inositol aux dépens de la molécule phosphatidique initiale. Afin d'éviter au maximum une telle dégradation et l'oxydation des phospholipides que nous nous sommes proposée d'étudier, nous avons utilisé des germes préparés depuis moins de 24 heures.

L'EXTRACTION, LA SEPARATION ET LA PURIFICATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES.

Les acides phosphatidiques du germe de blé ont été préparés à l'aide de la technique que nous avons utilisée pour obtenir les acides phosphatidiques du muscle cardiaque (12°).

Au cours de quelques essais préliminaires nous avons constaté que l'extraction directe des germes de blé entiers par l'alcool méthylique conduit à un aussi bon rendement en phosphatides que l'extraction des germes préalablement broyés à l'aide d'un "Turmix". Nous avons également constaté qu'après l'extraction par de l'alcool méthylique l'éther n'extrait que des quantités infimes de phosphatides.

1°) Principe de la technique de préparation des acides phosphatidiques.

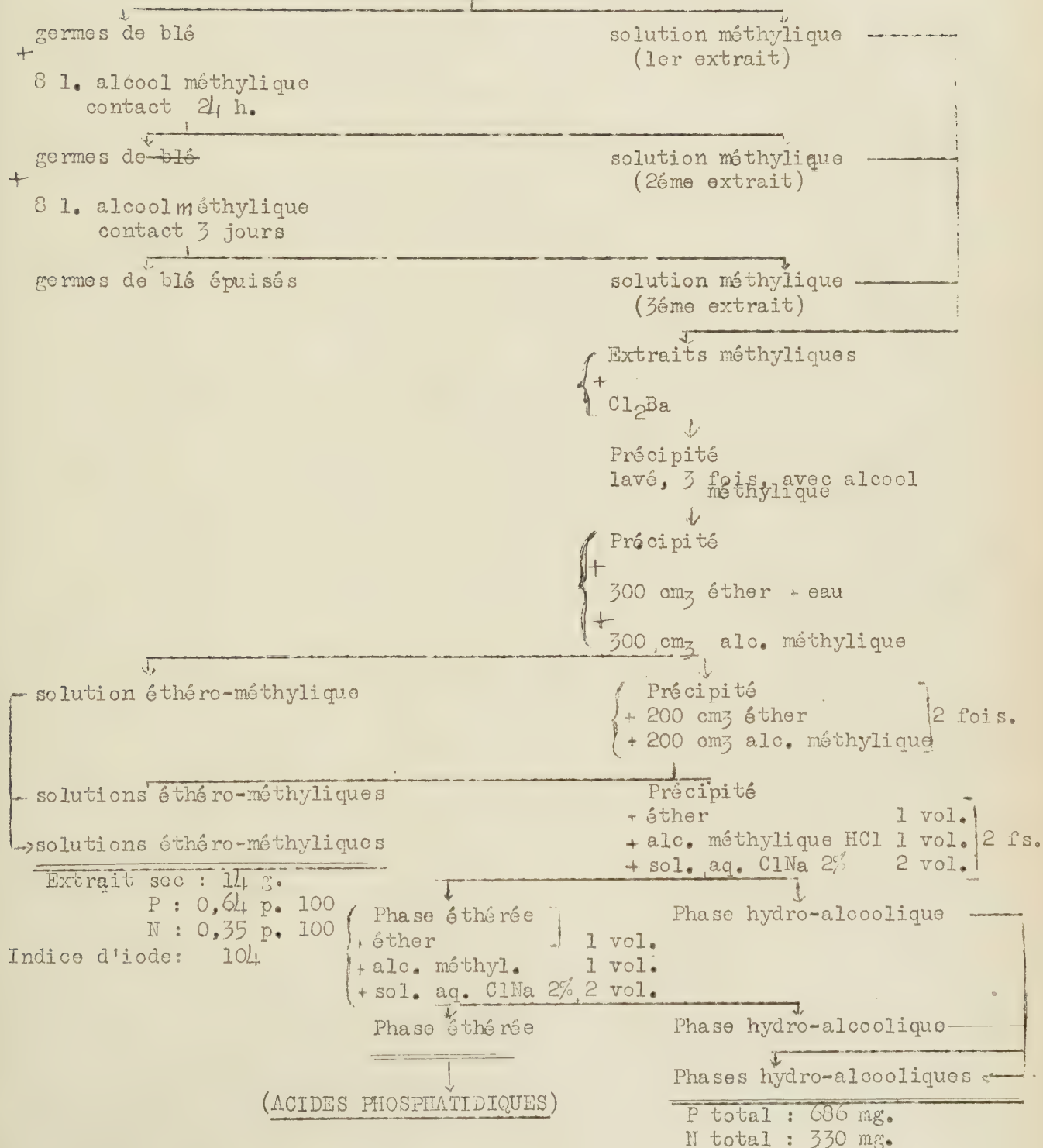
Les germes de blé sont extraits par de l'alcool méthylique. L'addition de chlorure de baryum à la solution méthylique précipite les substances à caractère acide : les acides phosphatidiques, certains phosphatides azotés, des acides gras et des substances non lipidiques. On décompose l'ensemble des sels de baryum par un acide dilué et l'on sépare les composés lipidiques d'avec les composés non lipidiques grâce à la solubilité des premiers dans l'éther et des seconds dans l'eau. On procède, ensuite, au fractionnement des phosphatides qui sont contenus dans la phase étherée.

2°) Technique de préparation des acides phosphatidiques. (tableau I).

On traite 5 kg. de germes de blé par 10 litres d'alcool méthylique. Après 24 heures de contact, à la température du laboratoire, on sépare la solution méthylique en exprimant la masse dans un sac en grosse toile puis, on traite deux fois encore les germes par 8 litres d'alcool méthylique, chaque fois, dans les mêmes conditions - lors de la troisième extraction,

PREPARATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

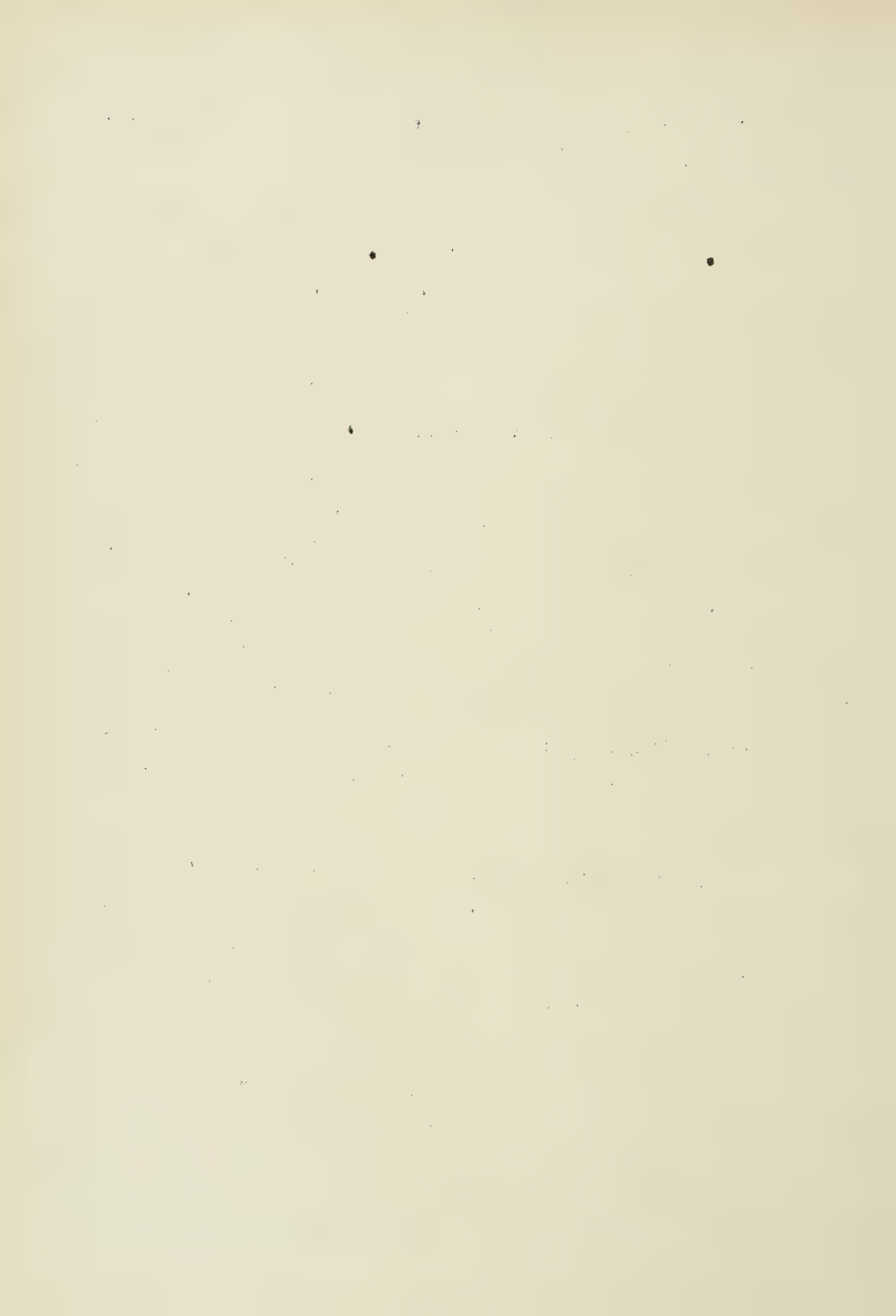
5 kg. de germes de blé
+ 10 l. alcool méthylique
contact 24 h.



le temps de contact est, toutefois, porté de 24 heures à 3 jours et l'ensemble est agité fortement, sur agitateur mécanique, avant d'être soumis à la filtration -.

On réunit les solutions méthyliques, on les filtre sur papier, on les additionne d'une solution aqueuse à 40 p.100 de chlorure de baryum jusqu'à ce qu'il ne se forme plus qu'un léger louche dans la solution surnageant le précipité. et on les place à la glacière. Après décantation spontanée, on élimine la majorité de la solution-mère par aspiration et on sépare le précipité par centrifugation. Ce précipité barytique est lavé, trois fois, avec de l'alcool méthylique : on le purifie en le mettant en suspension dans 300 cm₃ d'éther et 20 cm₃ d'eau et en le précipitant par 300 cm₃ d'alcool méthylique. Le précipité est de nouveau traité par 200 cm₃ d'éther qui le dissolvent parfaitement et précipité par 200 cm₃ d'alcool méthylique; on renouvelle, une fois encore, cette dissolution dans l'éther et cette précipitation par l'alcool méthylique.

Le précipité de sels de baryum, ainsi obtenu, est alors dissous dans 250 cm₃ d'éther auxquels on ajoute progressivement, en agitant constamment, 125 cm₃ d'alcool méthylique contenant 20 p.100 d'acide chlorhydrique concentré puis, un mélange de 125 cm₃ d'alcool méthylique et de 500 cm₃ de solution aqueuse à 2 p.100 de chlorure de sodium - ces solutions étant préalablement refroidies à la glacière -. Après agitation, on sépare les deux phases qui se forment par une brève centrifugation et on élimine, par aspiration, la phase hydro-



alcoolique jaune. On additionne la phase éthérée de 125 cm₃ d'éther puis on la traite par 125 cm₃ d'alcool méthylique contenant 20 p.100 d'acide chlorhydrique et par 125 cm₃ d'alcool méthylique mélangés à 500 cm₃ de solution aqueuse à 2 p.100 de chlorure de sodium. On élimine la phase hydro-alcoolique comme précédemment et on traite, une troisième fois, la phase éthérée par 75 cm₃ d'éther que l'on additionne de 100 cm₃ d'alcool méthylique et de 400 cm₃ de solution aqueuse à 2 p.100 de chlorure de sodium. On élimine la troisième phase hydro-alcoolique incolore et il reste une phase éthérée très concentrée.

FRACTIONNEMENT DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES.

FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES.

1°) Principe du fractionnement et de la purification des acides phosphatidiques.

Fractionnement - On fractionne les phosphatides contenus dans la phase étherée par addition d'un excès d'acétone : des acides glycérophosphatidiques et les acides gras restent en solution et constituent la fraction - soluble acétone " S " - le précipité formé renferme la majeure partie des céphalines et d'autres composés phosphorés et constitue la fraction "Insoluble acétone". On sépare les acides phosphatidiques contenus dans la fraction " S " en les précipitant sous forme de sels de sodium par addition d'acétate de sodium. On soumet la fraction "Insoluble acétone" à un nouveau fractionnement en traitant sa solution étherée par de l'alcool éthylique absolu. Une partie de ses éléments reste en solution et constitue la fraction - Soluble alcool " S' " - tandis que l'autre partie précipite et constitue la fraction - Insoluble alcool " I " -. Ensuite, on forme les sels de sodium de chacune de ces deux fractions " S' " et " I " en neutralisant leurs solutions éthéro-alcooliques par de la soude méthylique.

Elimination de l'azote - Les trois fractions " S ", " S' " et " I ", à ce stade de leur préparation, renferment encore un peu d'azote (de 0,1 à 0,23 p.100). On convertit leurs sels de sodium en sels de baryum que l'on purifie, ensuite, par précipitation des solutions étherées (" S " et " S' ") ou de

la solution chloroformique (" I ") par du méthanol en présence d'acide acétique glacial. Les sels de baryum, ainsi purifiés, ne renferment plus que des traces d'azote (N : de 0,02 à 0,08 p.100).

Finalement " S ", " S' " et " I " sont à nouveau converties en sels de sodium et sont mises en solution dans de l'alcool méthylique.

2°) Technique du fractionnement et de la purification des acides phosphatidiques. (tableau II). (tableau III).

Fractionnement - La phase étherée très concentrée renfermant les acides phosphatidiques est additionnée de 200 cm₃ d'acétone; il se sépare un important précipité dénommé "Insoluble acétone HCl" que l'on redissout dans 50 cm₃ d'éther et reprécipite par addition de 100 cm₃ d'acétone.

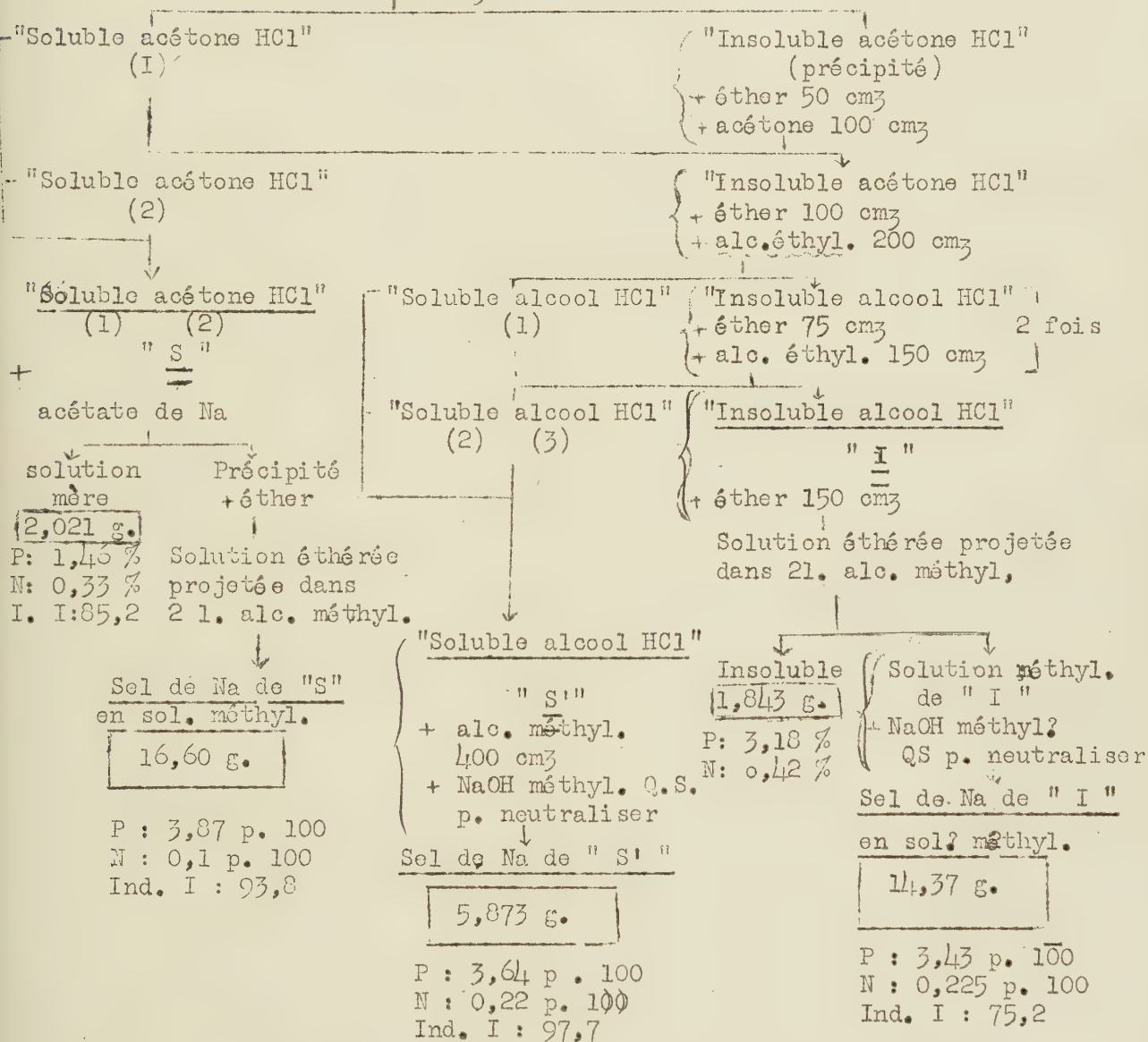
Les deux solutions-mères éthéro-acétoniques sont réunies; elles renferment la fraction " S " - Soluble acétone HCl - dont on forme le sel de sodium en précipitant ces solutions éthéro-acétoniques par une solution aqueuse à 30 p.100 d'acétate de sodium. On dissout, ensuite, le précipité de phosphatidates de sodium dans de l'éther et l'on projette la solution étherée obtenue dans 2 litres, environ, de méthanol.

La fraction "Insoluble acétone HCl" mise en solution dans 100 cm₃ d'éther est traitée par 200 cm₃ d'éthanol ; il se sépare un précipité important, dénommé fraction " I " - Insoluble alcool HCl -, que l'on remet en solution dans 75 cm₃ d'éther et traite à nouveau par 150 cm₃ d'éthanol. On effectue

TABLEAU II

FRACTIONNEMENT DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES

Phase étherée (renfermant l'ensemble des ACIDES PHOSPHATIDIQUES)
+
acétone 200 cm³



ELIMINATION DE L'AZOTE

Sel de Na de " S "

en solution méthylique
+ Cl₂Ba

- Sol.-mère Précipité
(sel de Ba de "S")
+ éther 100 cm₃
+ acide acétique 10 cm₃
+ alc. méthyl. 100 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ éther 75 cm₃
2 fs. + ac. acétique 7,5 cm₃
+ alc. méthyl. 75 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ éther 75 cm₃
+ alc. méthyl. 75 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ éther 100 cm₃
+ acétone 100 cm₃

Sol.-mères Précipité
(éther+ac. + éther 75 cm₃
acétique+alc. + acétone 75 cm₃
éthyl.)

5,021 g.) Sel de Ba purifié
de " S "

P : 0,81 p.100

N : 0,12 p.100 P : 3,69 p.100

Ind. I : 43,6 N : 0,017 p.100

$\frac{P}{Ba}$: 1,01

sucres : 0,15 p.100

Transformation en sel
de Na

Sel de Na purifié
de " S "

12,11 g.)

P : 3,94 p.100

Ind. i : 95,1

Sel de Na de " I "

en solution méthylique
+ Cl₂Ba

- Sol.-mère Précipité
(sel de Ba de "I")
+ chloroforme 60 cm₃
+ ac. acétique 6 cm₃
+ alc. méthyl. 100 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ chloroforme 50 cm₃
+ ac. acétique 5 cm₃
+ alc. méthyl. 100 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ chloroforme 30 cm₃
+ ac. acétique 3 cm₃
+ alc. méthyl. 50 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ chloroforme 30 cm₃
+ alc. méthyl. 50 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ alc. méthyl. 50 cm₃
- Sol.-mère Précipité
+ alc. méthyl. 50 cm₃

Sol.-mère Sel de Ba purifié
de " I "

Sol.-mères P : 3,50 P.100

4,900 g.) N : 0,088 p.100

P : 2,21
p.100 $\frac{P}{Ba}$: 1,70

sucres : 0,27
p.100

Ind. I : 66,8

Ind. I : 67,4 Transformation en sel
de Na

Sel de Na purifié
de " I "

9,280 g.)

P : 3,62 p.100

Ind. i : 64

une troisième fois ce traitement éther-éthanol. Aux solutions éthéro-éthyliques renfermant la fraction " S' " - Soluble alcool HCl -, on ajoute 400 cm₃ d'alcool méthylique et on neutralise ces solutions par addition d'une quantité suffisante de solution méthylique normale de soude; le sel de sodium de la fraction " S' " est ultérieurement transformé en sel de baryum que l'on conserve sous de l'alcool méthylique. Quant à la fraction " I ", on la met en solution dans 150 cm₃ d'éther et l'on projette, goutte à goutte, cette solution émulsionnée dans 2 litres d'alcool méthylique, en agitant vigoureusement. Il se sépare un léger précipité floconneux qui demeure insoluble dans l'alcool méthylique mais se dissout bien dans le chloroforme et dont la teneur en azote est relativement élevée (N : 0,42 p.100). On neutralise, ensuite, la solution méthylique de la fraction " I " par addition d'une quantité suffisante de solution méthylique normale de soude.

Elimination de l'azote - Les sels de sodium des deux fractions " S " et " I ", ainsi obtenus, renferment une petite quantité d'azote (N : de 0,1 à 0,23 p.100). On les convertit en sels de baryum par addition d'une solution aqueuse à 20 p.100 de chlorure de baryum à leurs solutions méthyliques respectives, jusqu'à cessation de précipitation. Ensuite, on soumet ces sels de baryum au traitement suivant :

On dissout le sel de baryum de la fraction " S " dans 100 cm₃ d'éther, on ajoute 10 cm₃ d'acide acétique glacial pour décomposer les savons de baryum formés et on précipite les phosphatides de baryum par addition de 100 cm₃ d'alcool



méthylliques. On répète l'opération, deux fois encore, en traitant le précipité précédent par 75 cm₃ d'éther, 7,5 cm₃ d'acide acétique et 75 cm₃ d'alcool méthylique. Ensuite, on élimine l'acide acétique qui imprègne le précipité en redissolvant celui-ci dans 75 cm₃ d'éther et en le reprécipitant par addition de 75 cm₃ d'alcool méthylique. On refait cette dernière opération une fois encore et on lave finalement le précipité avec 100 cm₃ d'alcool méthylique.

On dissout le sel de baryum de la fraction " I " dans 60 cm₃ de chloroforme (l'emploi de l'éther, même hydraté, ne permet pas d'obtenir une dissolution parfaite), on ajoute 6 cm₃ d'acide acétique glacial et on précipite les sels de baryum de cette fraction par addition de 100 cm₃ d'alcool méthylique. On répète l'opération, deux fois encore, en traitant le précipité précédent d'abord par 50 cm₃ de chloroforme, 5 cm₃ d'acide acétique glacial et 100 cm₃ d'alcool méthylique puis par 30 cm₃ de chloroforme, 3 cm₃ d'acide acétique glacial et 50 cm₃ d'alcool méthylique. Ensuite, on dissout le précipité dans 30 cm₃ de chloroforme, on le précipite à nouveau par addition de 50 cm₃ d'alcool méthylique et on le lave finalement avec 50 cm₃ d'alcool méthylique.

Nous obtenons, ainsi, les sels de baryum purifiés de chacune des deux fractions " S " et " I ". Ces sels de baryum sont reconvertis en sels de sodium en utilisant la technique que nous avons exposée plus haut pour le sel brut : (dissolution dans de l'éther hydraté, addition d'un égal volume d'alcool méthylique acidifié par HCl et de deux volumes

de solutions aqueuse à 2 p.100 de chlorure de sodium, ensuite, projection de la solution étherée d'acides libres dans de l'alcool méthylique et neutralisation de cette solution éthérométhylique par une solution méthylique normale de soude).

COMPOSITION DES FRACTIONS " S " ET " I ".

Les sels de sodium purifiés des fractions " S " et " I " possèdent la composition suivante :

	<u>Fraction " S "</u>	<u>Fraction " I "</u>
Phosphore	3,94 p.100	3,62 p.100
Indice d'iode	95,1 . .	64
Oses	0,15 p.100	0,27 p.100
Glycérol	} Recherche qualitative } après hydrolyse de la fraction et isolement	Présence
Inositol		Présence

Les sels de baryum purifiés de ces mêmes fractions ont un P/Ba égal à :

1,01

1,70

De l'examen de ces données il ressort que les deux fractions " S " et " I " correspondent à des substances phosphatidiques notablement différentes. Elles ne possèdent ni la même teneur en phosphore ni les mêmes indices d'iode. La fraction " S " ne renferme pas d'inositol et semble être constituée par une ou des substances présentant 2 fonctions acides libres par atome de phosphore. La fraction " I " renferme, à la fois, du glycérol et de l'inositol; la valeur de son rapport P/Ba est nettement supérieure à 1, ceci permet d'émettre l'hypothèse qu'elle renferme, en quantité importante, une ou des substances ne présentant qu'une seule fonction acide

libre par atome de phosphore.

TENTATIVES DE PURIFICATION DE LA FRACTION " I ".

Dans l'espoir d'obtenir une fraction ayant un rapport P/Ba égal à 2, nous avons effectué quelques essais de fractionnement de "I", préparée à partir d'un autre lot de 5 kg. de germes de blé.

1°) Nouveau fractionnement de " I " par l'alcool éthylique et par l'alcool méthylique.

La fraction " I " étant sous forme de sels de baryum, nous l'avons soumise au traitement : éther, alcool méthylique chlorhydrique, solution aqueuse à 2 p.100 de ClNa , pour obtenir les acides libres en solution éthérée. Ensuite, nous avons projeté, goutte à goutte, cette solution éthérée dans deux volumes d'alcool éthylique agité vigoureusement. Il s'est formé un insoluble que l'on a séparé de la solution-mère et qui, redissous dans de l'éther, a été à nouveau projeté dans deux volumes d'alcool éthylique. L'insoluble alors obtenu a été soumis une troisième fois à ce même traitement : dissolution dans de l'éther et projection dans de l'alcool éthylique.

Les solutions-mères ont été réunies et neutralisées par de la baryte méthylique. Le précipité formé représentait la fraction " A " - Soluble dans l'alcool éthylique -.

Quant au précipité, fraction " B " - Insoluble dans l'alcool éthylique -, il a été redissous dans un volume suffisant d'éther et projeté, goutte à goutte, dans un grand volume

d'alcool méthylique agité fortement (1 litre d'alcool méthylique pour 100 cm₃ d'éther). Le petit insoluble formé a été éliminé par filtration et la solution éthéro-méthylique a été neutralisée par de la baryte méthylique. Le précipité de sels de baryum obtenu a été, finalement, soumis au traitement suivant, renouvelé plusieurs fois : dissolution dans de l'éther ou dans du chloroforme et précipitation par de l'alcool méthylique.

La fraction " I " de départ a donc donné naissance à deux nouvelles fractions : " A " et " B ", légèrement différentes quant à la valeur de leur rapport P/Ba, mais celle-ci n'a pu toutefois s'approcher suffisamment de 2 comme il aurait été permis de l'espérer.

Voici les résultats fournis par un nouveau fractionnement de " I " par l'alcool éthylique :

	Fraction " I " initiale (sel de Ba)	Fraction " A " "soluble alcool éthylique" (sel de Ba)	Fraction " B " "insoluble alcool éthylique" (sel de Ba)
Phosphore p.100	3,39	3,46	3,4
P/Ba	1,60	1,54	1,70

2°) Fractionnement de " I " par l'acide acétique.

Sur la fraction " A " - Soluble dans l'alcool éthylique qui a été obtenue au cours de l'essai que nous venons d'indiquer, nous avons tenté un fractionnement par l'acide acétique.

Le précipité de sels de baryum a été dissous dans un petit volume de chloroforme et additionné d'acide acétique

concentré jusqu'à cessation de précipitation. L'insoluble formé a été encore traité, deux fois, de la manière suivante : dissolution dans un petit volume d'éther et précipitation par addition de deux volumes d'acide acétique. Le précipité obtenu finalement correspondait à la fraction "Insoluble dans l'acide acétique" tandis que les trois solutions-mères, additionnées d'alcool méthylique, fournissaient un précipité constituant la fraction "Soluble dans l'acide acétique".

Les résultats obtenus par le traitement acétique de " A " étaient les suivants :

	Fraction " A " "Sol. alc. éthyl." <u>(sel de Ba)</u>	Soluble dans acide acétique <u>(sel de Ba)</u>	Insoluble dans acide acétique <u>(sel de Ba)</u>
Phosphore p.100	3,45	3,69	3,62
P/Ba	1,54	1,58	1,68
Poids de la fraction		416 mg.	310 mg.

La fraction "Insoluble dans l'acide acétique" avait bien, conformément à ce qui était attendu, un rapport P/Ba supérieur à celui de la fraction "Soluble dans l'acide acétique", mais la différence était trop peu marquée pour que d'autres tentatives de purification de " I ", par ce procédé, fussent envisagées.

Il apparaissait de plus en plus nettement que le problème relatif à l'obtention d'une fraction " I " ayant un rapport P/Ba égal à 2 serait difficile à résoudre lorsque, quelques observations relevées sur divers échantillons de cette fraction, conservés à la température du laboratoire, orientèrent

différemment notre travail. Ainsi, nous avons remarqué la présence d'un dépôt cristallin dans :

1°) - une solution méthylique de sels de sodium de la fraction brute "Insoluble acétone HCl" provenant de l'extraction de 1 kg. de germes de blé; cette solution, dont la concentration était de 8 mg. par cm_3 , avait été conservée, pendant un an, à une température de 20° environ.

2°) - une solution méthylique de sels de sodium de la fraction "Insoluble alcool HCl" obtenue à partir de 5 kg. de germes de blé (ils'agissait là d'une fraction non purifiée sous forme de sels de baryum). Cette solution était conservée depuis 3 mois, environ.

Quelques déterminations de la teneur en phosphore et de la valeur du rapport P/Ba de ces dépôts cristallins, convertis en sels de baryum, se rapprochaient sensiblement des résultats que nous nous proposons d'obtenir, c'est pourquoi nous avons essayé d'isoler, à partir de diverses fractions " I ", un tel précipité cristallisé.

Le premier essai de cristallisation a été effectué sur une solution méthylique concentrée (18 mg., environ, par cm_3) de sels de sodium de la fraction " B " - Insoluble dans l'alcool éthylique - dont il a été question dans le paragraphe relatif aux tentatives de purification de " I " par l'alcool éthylique. Une fraction insoluble, amorphe, s'est déposée tout d'abord à la température du laboratoire; on l'a éliminée. Un produit cristallisé blanc, présentant un aspect bien caractéristique, s'est séparé lentement par la suite. Son se l

de baryum possédait un rapport P/Ba égal à 2.

Nous avons, alors, préparé de nouvelles fractions " I " à partir desquelles il a été possible d'isoler des quantités appréciables de cristaux. Nous allons décrire leur mode d'obtention et l'étude analytique qui nous a permis de les identifier.

ISOLEMENT PAR CRISTALLISATION.

La fraction " I ", des acides phosphatidiques de germes de blé préparés et fractionnés selon la technique que nous avons détaillée, est purifiée sous forme de sel de baryum puis elle est convertie en sel de sodium. La solution méthylique tiède de ce sel est concentrée, sous vide, jusqu'à apparition d'un léger louche. En laissant cette solution refroidir lentement, à la température du laboratoire, il se sépare rapidement un insoluble amorphe que l'on élimine par filtration. Après 48 heures, environ, il se dépose sur les parois du récipient de nombreuses petites masses blanches sphéroïdales qui augmentent progressivement et finissent par se joindre en une couche très compacte. A la surface de la solution, il apparaît des plaques flottantes constituées, également, par un agrégat de ces petites masses cristallisées. Quatre jours après le début de la cristallisation, le produit est placé dans une glacière à + 4° où s'achève le dépôt des cristaux. Après cinq jours, la cristallisation paraît être achevée. La solution-mère, dont la concentration n'est plus que de 3 ou 4 mg. par cm³, est décantée; le précipité cristallisé est récolté et lavé avec de l'alcool méthylique refroidi à 0°.

Le précipité est, alors, purifié par une deuxième cristallisation dans de l'alcool méthylique : le précipité, dissous dans un petit volume de chloroforme, est projeté dans un excès d'alcool méthylique agité vigoureusement. Après élimination, par filtration, d'un petit insoluble, la solution chloroformo-méthylique tiède est concentrée, sous vide, jusqu'à apparition d'un très léger louche. On laisse refroidir très lentement à la température du laboratoire : la cristallisation s'effectue rapidement. 24 heures après, on place la solution dans une glacière à + 4° où s'achève la cristallisation.

Les cristaux obtenus possèdent les caractéristiques suivantes :

1°) Composition.

sel de sodium -----	{ Phosphore p.100	:	3,55
	{ Indice d'iode	:	56,4
Hydrolysats -----	{ Glycérol	:	présence
	{ Inositol	:	présence

Sel de sodium converti en sel de baryum.

P/Ba : 2,0

2°) Propriétés physiques.

a) Forme cristalline.

Le produit se présente sous la forme de spéroïdes rugueux et compactes. En examinant ces masses à l'aide d'

un microscope polarisant, on constate qu'elles sont constituées par de fines aiguilles biréfringentes qui s'irradient à partir d'un centre.

b) Solubilité.

Les cristaux (sel de sodium) sont solubles dans l'éther légèrement hydraté et très solubles dans le chloroforme.

Ils sont insolubles dans l'éther anhydre.

Ils sont peu solubles dans l'alcool méthylique (0,4 p.100, environ, à + 4°). Ils sont insolubles dans l'alcool éthylique et dans l'acétone. Dans l'eau, ils forment des solutions colloïdales.

c) Point de fusion. (Micro-détermination)

Le centre de chaque petite masse cristalline se liquéfie entre 125 et 130°; la fusion est totale vers 145 - 150°. Par refroidissement lent, chaque masse prend un aspect amorphe.

PROPRIETES SEROLOGIQUES DE LA FRACTION " S " ET DES CRISTAUX.

Pour effectuer le sérodiagnostic de la syphilis, on utilise un antigène constitué par les acides glycérophosphatidiques du muscle cardiaque - cardiolipide de Pangborn - associés à de la lécithine et au cholestérol.

Les acides glycérophosphatidiques du germe de blé, fractions " S " et " S' ", peuvent remplacer le cardiolipide. Par contre, le produit phosphatidique cristallisé est totalement dénué d'activité sérologique : nous avons effectué des réactions de fixation du complément (technique de Kolmer)

et des réactions de floculation (technique de Kline) avec des sérums de sujets syphilitiques et des sérums de sujets sains.

ETUDE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DU PHOSPHATIDE CRISTALLISE.

HYDROLYSE DU PHOSPHATIDE CRISTALLISE.

Afin d'élucider la constitution chimique de la substance phosphatidique cristalline, nous avons mis au point une technique d'hydrolyse, en deux temps, qui permet de scinder cette substance en ses différents constituants.

1°) Principe de l'hydrolyse :

a) - Pour ne pas être gênée ultérieurement par la présence du cation (ion sodium) du phosphatide cristallisé, on soumet ce dernier au traitement acide habituel (éther, alcool méthylique chlorhydrique, eau salée à 2 p.100) qui permet d'obtenir le phosphatide sous forme d'acide libre.

b) - Les acides gras de l'acide phosphatidique étant très oxydables, on cherche à les détacher le plus rapidement possible du reste de la molécule sans les altérer. C'est pourquoi on réalise l'hydrolyse en deux temps :

- dans le premier temps, on libère les acides gras que l'on dissout, ensuite, dans de l'éther; le reste de la molécule demeure en solution dans l'eau.
- dans le deuxième temps, on achève l'hydrolyse de la seule partie hydrosoluble.

Nous avons contrôlé que la totalité des acides gras était libérée, en vérifiant que l'extract éthéré de l'hydrolysate ne renfermait plus de phosphore.

Nous avons, ainsi, établi que les conditions nécessaires

à une séparation totale des acides gras sont les suivants :
dissolution de l'acide phosphatidique libre dans de l'alcool éthylique, normal en acide chlorhydrique, - ébullition à reflux pendant 1 heure.

c) - La fraction hydrosoluble renfermant du glycérol et de l'inositol qui sont en partie estérifiés par de l'acide phosphorique on cherche, dans le deuxième temps de l'hydrolyse, à obtenir la totalité de ces trois constituants à l'état libre. On parvient à ce résultat en soumettant la solution aqueuse de cette fraction à un chauffage de 2 heures à 150°. L'hydrosoluble se trouve alors scindé en acide phosphorique, que l'on précipite sous forme de phosphate de plomb, en glycérol et en inositol. On sépare le glycérol de l'inositol grâce à la solubilité du premier dans un mélange, à parties égales, d'alcool éthylique et d'éther ; l'inositol est insoluble dans ce solvant.

2°) Réalisation pratique de l'hydrolyse :

On dissout 630 mg., environ, de phosphatide cristallisé dans 4 cm₃ d'éther hydraté. On ajoute 2 cm₃ d'alcool méthylique contenant 20 p.100 d'acide chlorhydrique puis, le mélange de 2 cm₃ d'alcool méthylique avec 8 cm₃ de solution aqueuse à 2 p.100 de chlorure de sodium. Il se forme deux phases. On élimine la phase hydro-alcoolique qui renferme le cation sodium et on traite la phase étherée, qui renferme l'acide phosphatidique, deux fois encore comme précédemment.

Après évaporation, sous vide, de la phase étherée, on dissout le résidu (acide phosphatidique) dans 20 cm₃ d'

alcool éthylique contenant 10 p.100 d'acide chlorhydrique et on effectue le premier temps de l'hydrolyse en maintenant l'ébullition à reflux de cette solution, pendant 1 heure.

Ensuite, on évapore, sous vide, l'alcool éthylique chlorhydrique. On reprend les produits de l'hydrolyse par 10 cm₃ d'eau et 5 cm₃ d'éther. Après agitation, on sépare la phase étherée qui a dissous les acides gras et on extrait, deux fois encore, la phase aqueuse par 5 cm₃ d'éther. On obtient ainsi, d'une part, la solution étherée des acides gras et, d'autre part, la phase aqueuse qui renferme la fraction hydrosoluble de l'hydrolysât.

On élimine la totalité de l'acide chlorhydrique contenu dans la phase aqueuse par entraînement à l'aide de vapeur d'eau. On dissout la fraction hydrosoluble dans 10 cm₃, environ, d'eau distillée et on la soumet au deuxième temps de l'hydrolyse, dans un autoclave à 150°, pendant 2 heures.

On précipite l'acide phosphorique, contenu dans cet auto-hydrolysât, sous la forme de phosphate de plomb par addition d'une solution d'acétate basique de plomb; on vérifie que la totalité du phosphore est précipitée et se trouve entièrement à l'état minéral.

Dans la solution-mère du phosphate de plomb, on décompose l'excès de sous-acétate de plomb par un courant d'hydrogène sulfuré. On sépare le sulfure de plomb formé et on évapore la solution à sec de façon à éliminer l'excès d'hydrogène sulfuré et l'acide acétique libéré.

Le résidu d'évaporation renferme l'inositol et le

glycérol. On extrait ce dernier par de l'alcool-éther (1/1) : 2 + 1 + 1 cm₃. On pèse les fractions : - soluble dans l'alcool-éther - et - insoluble dans l'alcool-éther - et on identifie le glycérol et l'inositol qui les constituent.

IDENTIFICATION DE LA FRACTION - SOLUBLE DANS L'ALCOOL-ETHER -

Caractérisation du glycérol.

1°) Réaction colorée de Denigès.

Le glycérol, oxydé par l'eau de brôme, donne de la dioxycétone qui, sous l'action de l'acide sulfurique concentré, se transforme en méthylglyoxal : le méthylglyoxal donne avec la codéine une coloration vert-canard intense.

On oxyde 0,1 cm₃ de solution à 1 p.1000 de la fraction à étudier en la chauffant, pendant 20 minutes, dans un bain-Marie bouillant avec 5 cm₃ d'eau de brôme à 0,3 cm₃ p.100 cm₃. On chasse l'excès de brôme à l'ébullition puis on ajuste le volume de la solution à 10 cm₃ avec de l'eau distillée. On prélève 0,4 cm₃ de cette solution, on ajoute 3 gouttes d'une solution alcoolique à 5 p.100 de codéine et 2 cm₃ d'acide sulfurique puis on porte le mélange dans un Bain-Marie bouillant pendant 3 minutes. Il se développe la coloration caractéristique vert-canard.

2°) Formation d'un triesterbenzoïque du glycérol dont on détermine le point de fusion.

On verse 1,2 cm₃ de chlorure de benzoyle dans 230 mg. de glycérol (ou de la fraction à étudier) dissous dans 2 cm₃ de pyridine anhydre que l'on agite vigoureusement. La tota-

lité du chlorure de benzoïle doit être versée en 20 minutes, environ, et, pendant ce temps, on maintient le mélange à basse température. Il se forme une masse granuleuse que l'on porte dans un bain-Marie à 37° , pendant une demi-heure, puis dans un bain d'huile à 140° , pendant quelques instants, en assurant une ébullition à reflux. Après refroidissement, on obtient une masse compacte rougeâtre au sein d'une solution-mère brune. On extrait alors, 3 fois, le mélange obtenu par de l'éther et on soumet la solution éthérée au traitement suivant : acidification par de l'acide chlorhydrique N, lavage 1 fois avec de l'eau distillée, alcalinisation par de la soude N et lavage avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité puis, on l'évapore à sec. On déshydrate le résidu par addition d'alcool éthylique absolu que l'on élimine, ensuite, par distillation, et on dissout le résidu anhydre dans $2,4 \text{ cm}_3$ d'alcool éthylique absolu chaud. On laisse refroidir lentement et, après cristallisation, on filtre le mélange sur filtre d'Iena G_4 . Les cristaux blanchâtres que l'on sépare, ainsi, sont redissous dans $1,9 \text{ cm}_3$ d'alcool éthylique absolu chaud, refroidis lentement et séparés à nouveau par filtration sur G_4 . Finalement, on place ces cristaux dans une étuve à 110° pour éliminer l'alcool éthylique puis dans un dessiccateur où une cristallisation lente s'effectue. On détermine, alors, les points de fusion des produits obtenus, d'une part, à partir de glycérol pur, d'autre part, à partir de la fraction - Soluble dans l'alcool-éther -.

Point de fusion du triesterbenzoïque

- de glycérol : 71° - 72°

- de la fraction - Soluble alcool-éther - : 70°6-72°

IDENTIFICATION DE LA FRACTION - INSOLUBLE DANS L'ALCOOL-ETHER -

Caractérisation de l'inositol.

1°) Réaction de Scherer.

L'inositol, oxydé par l'acide nitrique, donne de l'acide rhodizonique que l'on caractérise à l'état de sel de baryum grâce à sa coloration rouge et à la fluorescence verte qu'il présente en lumière ultra-violette. Cette réaction est très nette avec 0,5 mg. d'inositol.

Dans un tube à hémolyse on met quelques milligrammes du produit à examiner, "une tête d'épingle" d'acétate de baryum et 5 à 6 gouttes d'acide nitrique fumant. On chauffe doucement le tube sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à évaporation à sec de la solution : puis, on continue à chauffer avec précaution au-dessus de la flamme jusqu'à ce qu'il se produise une réaction vive avec un dégagement de bioxyde d'azote et un boursoufflement du résidu (chauffer assez fortement tout en évitant une calcination). On chasse l'excès d'acide nitrique par un courant d'air chaud. La coloration rouge du rhodizonate de baryum apparaît déjà. On dissout le résidu dans 2 ou 3 gouttes d'eau puis on ajoute quelques gouttes d'une solution à 10p.100 d'acétate de baryum pour transformer la totalité de l'acide rhodizonique en sel de baryum et pour "tamponner" la solution qui pourrait contenir encore quelques traces d'acide nitrique qui empêcherait la formation du rhodizonate de baryum.

suivant la quantité d'inositol contenu dans la prise d'essai, on obtient une coloration rose avec fluorescence verte qui est accompagnée ou non par la formation d'un précipité rouge.

2°) Cristallisations répétées de la fraction - Insoluble alcool-éther - dans l'alcool à 80° et détermination du point de fusion de cette fraction purifiée.

On dissout la fraction - Insoluble alcool-éther - dans un petit volume d'eau distillée (on n'utilise que ce qui est nécessaire pour obtenir une dissolution totale) et on ajoute de l'alcool éthylique absolu en quantité suffisante pour obtenir finalement un titre alcoolique de 80°. On porte à l'ébullition ce qui solubilise tout l'insoluble formé et on laisse refroidir la solution très lentement : de beaux cristaux apparaissent progressivement; on les sépare par filtration sur filtre d'Iéna G₃. Ces cristaux sont, ensuite, traités 2 fois encore de façon analogue c'est à dire, dissous dans un petit volume d'eau distillée et recristallisés, à partir de leur solution alcoolique à 80° bouillante, par refroidissement lent. Les cristaux finalement recueillis sur le filtre G₃ sont desséchés dans un dessiccateur et leur point de fusion est déterminé.

- 1°) au bloc Maquenne.

Point de fusion de la fraction - Insoluble alcool-éther - purifiée : 224° (comme celui de l'inositol étalon).

- 2°) par micro-détermination.

Point de fusion de la fraction - Insoluble alcool-
éther - purifiée : 221° (la fusion s'effectue en
même temps que celle de l'inositol type).

ETUDE DES ACIDES GRAS.

Les acides gras, libérés par le premier temps de
l'hydrolyse du phosphatide cristallisé, se présentent sous
forme d'esters éthyliques; il est donc nécessaire de les
saponifier avant de pouvoir en faire l'étude.

1°) Saponification et extraction des acides gras.

On dissout les esters éthyliques d'acides gras dans
14 cm³ de solution éthylique de potasse à 5 p.100 et on main-
tient l'ébullition à reflux de cette solution pendant 2 heures
(on opère en atmosphère d'azote). Il se forme ainsi des
savons de potassium qui sont, peut-être, souillés par de l'
insaponifiable, c'est pourquoi, on les extrait 3 fois, par de
l'éther de pétrole après avoir ajouté, à leur solution éthyli-
que, une quantité suffisante d'eau distillée pour obtenir
deux phases distinctes. Ensuite, on acidifie par de l'acide
chlorhydrique concentré la solution hydro-éthylique de savons
de potassium afin d'en libérer les acides gras, et on extrait
alors ceux-ci par de l'éther. On élimine toute trace d'aci-
dité de la solution éthérée d'acides gras par des lavages
répétés avec de l'eau distillée jusqu'à ce que la réaction soit
neutre ; ensuite, on évapore à sec cette solution éthérée
et on redissout les acides gras obtenus dans de l'acétone.
C'est à partir de cette solution acétonique, dont on détermine

la concentration en faisant un extrait sec sur une partie aliquote, que l'on effectue les déterminations d'indice d'iode et de poids moléculaire moyen des acides gras (l'oxydation est à redouter).

Si on examine les acides gras au microscope, on remarque qu'il s'agit d'un mélange d'acides gras solides et liquides; nous avons donc tenté leur fractionnement par cristallisation à basse température.

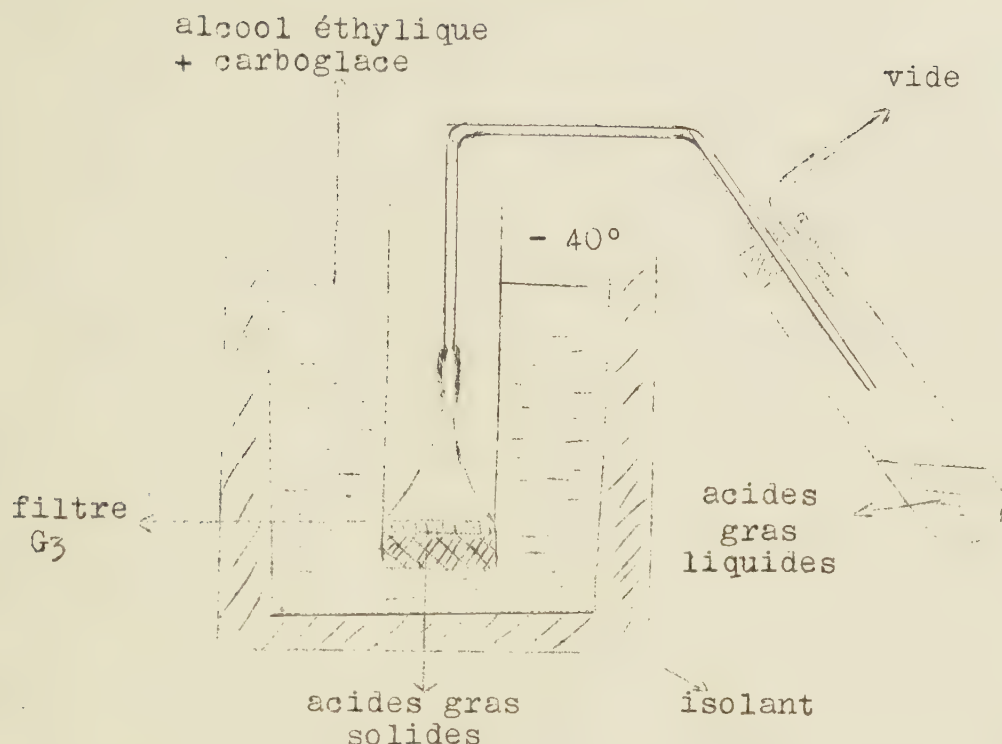
2°) Fractionnement des acides gras.

A cet effet, la solution acétonique d'acides gras est ramenée à une concentration de 10 p.100 et refroidie à -40° dans un mélange d'alcool éthylique et carboglace. On maintient cette température pendant 20 minutes, environ, après quoi on sépare la fraction cristallisée de la fraction demeurée liquide par aspiration de celle-ci à travers un petit filtre d'Iéna G₃ en faisant le vide dans le dispositif ci-contre.

On redissout, ensuite, la fraction cristallisée dans la quantité d'acétone nécessaire pour obtenir une solution à 10 p.100 (il faut chauffer légèrement); on la refroidit à -40° , pendant 20 minutes, et on sépare la nouvelle fraction liquide à cette température comme précédemment.

La fraction cristallisée à -40° est finalement purifiée par plusieurs cristallisations dans de l'alcool éthylique à 70° ; son indice d'iode devient alors négligeable et il est possible de l'identifier par la détermination de son poids moléculaire moyen et de son point de fusion.

Quant aux deux fractions liquides à -40° , elles sont



réunies et, connaissant leur indice d'iode et leur poids moléculaire moyen, on tente à nouveau de les fractionner en refroidissant leur solution acétonique à 10 p.100 à -70° . On sépare bien une fraction cristallisée d'une fraction liquide mais, à ce stade, les phénomènes d'oxydation étant particulièrement intenses puisqu'il s'agit de fractions très insaturées, il n'est pas possible de déterminer correctement leur indice d'iode et leur poids moléculaire moyen et, par suite, de les identifier.

Etude des acides gras du phosphatide cristallisé.

	Indice d'iode	Poids moléculaire	Point de fusion
Acides gras totaux	95	278	
Acides gras cristallisés à -40°	1,5	260	$61^{\circ}6$
Acide palmitique théorique	0	256	$61^{\circ}8$
Acides gras liquides à -40°	155	288	

Les acides gras du phosphatide cristallisé ont donc été séparés en deux fractions d'importance moléculaire sensiblement égale .

- a) Une fraction cristallisée à -40° identifiée à l'acide palmitique.
- b) Une fraction liquide à -40° constituée par un mélange d'acides gras non saturés.

Les acides gras renferment donc, en quantité approximativement équimoléculaires, l'acide palmitique et un mélange d'acides gras non saturés.

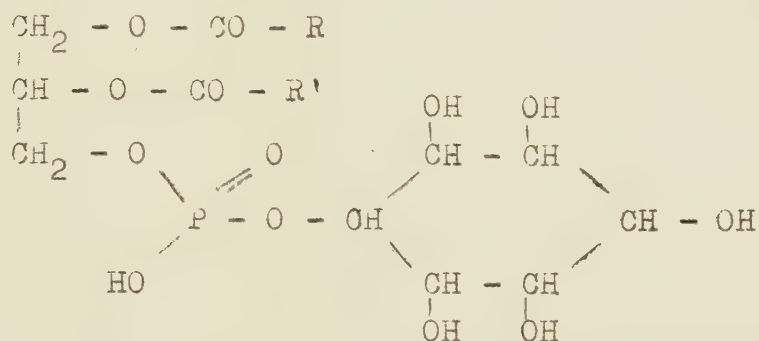
Les résultats fournis par l'étude de la constitution chimique du phosphatide cristallisé sont réunis dans le tableau suivant :

Analyse de 630 mg. de phosphatide cristallisé

acides gras		406,6 mg.
phosphore		22,07 mg.
glycérol (soluble alcool-éther)		66,1 mg.
inositol (insoluble alcool-éther)		132,3 mg.
rapport, molécule/atome		
	$\frac{\text{acides gras}}{\text{phosphore}}$	2,05
"	$\frac{\text{glycérol}}{\text{phosphore}}$	1,01
"	$\frac{\text{inositol}}{\text{phosphore}}$	1,03

Ces résultats analytiques montrent que la molécule du phosphatide est constituée par : une molécule de glycérol,

une molécule d'inositol, deux molécules d'acides gras et une molécule d'acide phosphorique dont une seule fonction acide est libre. Par analogie avec les autres p-phosphatides naturels connus nous nous schématisons cet acide glycéro-inosito-phosphatidique par la formule suivante :



R - COOH et R' - COOH représentant les acides gras.

STRUCTURE DE LA MOLECULE.

Afin d'étudier la structure de ce phosphatide, nous avons tenté d'obtenir par hydrolyse ménagée l'acide glycéro-inosito-phosphorique qui entre dans sa constitution; ce composé étant instable, nous ne sommes pas parvenue à l'isoler à l'état pur.

Par ailleurs, nous avons cherché à préciser la position des acides gras dans la molécule en étudiant les produits de l'oxydation périodique du phosphatide non dégradé.

ETUDE DES PRODUITS DE L'HYDROLYSE MENAGÉE DU PHOSPHATIDE.

Il était permis de penser qu'une hydrolyse appropriée permettrait de détacher les acides gras du phosphatide sans altérer l'acide glycéro-inosito-phosphorique. Pour étudier les produits obtenus dans les divers essais, nous avons procédé comme suit : les acides gras, après leur libération, sont extraits avec de l'éther en milieu acide et la solution aqueuse renfermant la fraction hydrosoluble est neutralisée. L'addition d'acétate ou de nitrate de plomb à cette solution provoque la précipitation de l'acide glycéro-phosphorique et de l'acide inosito-phosphorique; l'acide glycéro-inosito-phosphorique ne possédant qu'une seule fonction acide libre demeure en solution dans ces conditions. Le dosage du phosphore précipitable et du phosphore non précipitable par le plomb permet donc d'étudier rapidement l'état des produits d'hydrolyse au cours des essais.

1°) Hydrolyse acide.

Le phosphatide est converti en acide libre par le traitement habituel puis, on le dissout dans de l'alcool éthylique. On soumet cette solution à une ébullition à reflux. Dans ces conditions, les acides gras ne sont pas totalement libérés.

Pour libérer la totalité des acides gras, il est nécessaire d'additionner la solution éthylique d'acide chlorhydrique (q. s, N) et de maintenir l'ébullition pendant 1 heure. Dans ce cas, un septième seulement du phosphore demeure sous une forme non précipitable par le plomb.

2°) Hydrolyse alcaline.

On prépare une solution aqueuse colloïdale à 1 p.100 de sel de sodium du phosphatide. On l'additionne de soude de façon à obtenir une solution N/5. Une partie de la solution est plongée dans un bain-Marie bouillant pendant 1 heure. La 2^{ème} partie de la solution est maintenue à 37° pendant 16 heures.

Les hydrolysats sont refroidis à 0°, acidifiés par de l'acide nitrique et les acides gras sont extraits par de l'éther. Les solutions aqueuses sont neutralisées par de la soude et additionnées de nitrate de plomb. Dans les deux modalités d'hydrolyse, on ne retrouve qu'un tiers du phosphore non précipitable par le plomb.

3°) Hydrolyse spontanée.

L'hydrolyse spontanée d'une préparation nous a permis

d'obtenir le résultat désiré. Dans cette préparation, conservée depuis 2 mois, à la température du laboratoire, en solution méthylique très légèrement alcaline, la totalité des acides gras avait été libérée et la presque totalité du phosphore se trouvait sous une forme non précipitable par le plomb.

Cet ester phosphorique non précipitable par le plomb a été soumis à une hydrolyse chlorhydrique normale (1 heure à 100°); la totalité du phosphore pouvait alors être précipitée par le plomb. L'acide glycéro-inosito-phosphorique qui subsistait après le détachement des acides gras a donc été détruit, secondairement, par cette hydrolyse aqueuse acide, mais sa destruction n'a pas atteint le stade acide phosphorique libre.

A partir de ces sels de plomb insolubles dans l'eau, nous avons tenté de séparer l'acide glycéro-phosphorique de l'acide inosito-phosphorique grâce à la solubilité du premier acide dans l'alcool-éther (1 : 1) et à l'insolubilité du deuxième acide dans ce solvant. Nous avons obtenu une fraction "soluble alcool-éther (1 : 1)" qui était constituée, en majorité, par de l'acide glycéro-phosphorique que l'on a isolé et analysé à l'état de sel de baryum ($P = 10,3$ p.100; $Ba = 44,1$ p.100; $P/Ba = 1,03$), mais qui renfermait aussi du glycérol libre et de l'acide phosphorique. Une petite fraction de l'acide glycéro-phosphorique avait donc été hydrolysé mais l'acide phosphorique provenait, surtout, de l'acide inosito-phosphorique qui s'était en grande partie dédoublé au cours des manipulations. En effet, la fraction "insoluble alcool-éther (1 : 1)" ne renfermait qu'une très petite quantité d'acide

inosito phosphorique et était surtout constituée par de l'inositol.

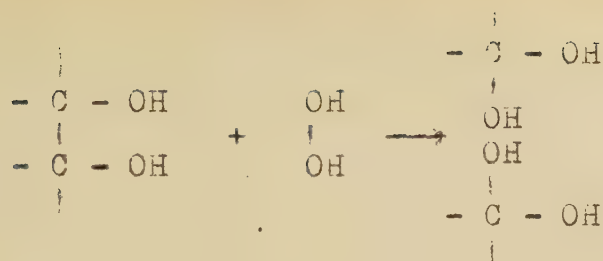
Un mois plus tard, nous avons tenté de purifier l'acide glycéro-inosito-phosphorique contenu dans l'hydrolysât spontané. Malheureusement, il s'était en grande partie dégradé, montrant combien ce produit est instable. Nous avons essayé de purifier cet acide par des précipitations répétées de son sel de Pb ou de Ba par l'alcool. Au cours de ces manipulations, le produit s'hydrolyse, libérant des acides précipitables par le plomb en milieu aqueux. Il n'est pas possible par cette technique de séparer une substance définie; nous avons obtenu, finalement, un sel de baryum présentant la composition suivante : P = 7,4 p.100; Ba = 19,6 p.100; P/Ba = 1,67 et contenant du glycérol et de l'inositol.

OXYLATION PERIODIQUE DU PHOSPHATIDE.

1°) Action de l'acide périodique sur les polyols. (9) (16)

En 1928, Malaprade découvrit que les polyols sont oxydés par l'acide périodique, en solutions aqueuses, à la température du laboratoire. A partir de 1930, P. Fleury et ses élèves précisèrent le comportement de ce réactif et mirent en évidence sa remarquable spécificité.

L'acide périodique exerce une action déshydrogénante sur deux atomes d'hydrogène situés sur deux carbones contigus. Cette modalité d'action est caractéristique de la réaction de Malaprade. Tout se passe comme si l'oxygène actif de l'acide périodique intervenait sous forme de peroxyde d'hydrogène :



Les polyols acycliques sont les composés qui sont oxydés le plus facilement : les fonctions alcool primaire sont déshydrogénées en formaldéhyde et les fonctions alcool secondaire oxydées en acide formique mais, seuls les polyols possédant un ou plusieurs groupements α -glycol sont oxydables.

Les polyols cycliques sont également oxydés mais la réaction est plus complexe et elle a été surtout étudiée d'une façon détaillée pour l'inositol par P. Fleury, C. Poirot et M. Flévet en 1945. L'oxydation se réalise en deux étapes : au cours du premier stade, très rapide, il y a ouverture du cycle et formation d'aldéhyde hydroxypyruvique $CH_2OH - CO - CHO$; ce dernier est alors oxydé en acides formique et glycolique. Au cours d'un second stade, l'acide glycolique est oxydé très lentement et d'une façon incomplète en acide formique et anhydride carbonique.

Quant aux esters phosphoriques de polyols, l'oxydation n'a lieu que si les atomes de carbone situés en α et β par rapport à la liaison ester portent les fonctions oxydables; les groupements éloignés de la liaison ester sont oxydés selon la règle de Malaprade-Fleury.

L'acide glycéro-inosito-phosphatidique du germe de blé doit être oxydable par l'acide périodique mais son oxydation est conditionnée par l'emplacement des acides gras dans la molécule puisque ceux-ci bloquent deux des fonctions oxyda-

bles.

Si donc, dans la molécule d'acide glycéro-inosito-phosphatidique, la fonction alcool- α du glycérol est estérifiée par l'acide phosphorique, les deux autres fonctions alcool peuvent être, soit estérifiées, soit libres.

- Si les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par les deux molécules d'acides gras (comme nous en avons émis l'hypothèse), le glycérol est inattaquable par l'acide périodique, seul l'inositol est oxydable; il en est de même, d'ailleurs si un seul acide gras se trouve fixé sur le glycérol, soit en α soit en β , l'autre estérifiant une des fonctions alcool de l'inositol - seule la quantité d'acide formique qui prend naissance au cours de l'oxydation peut varier dans ces cas.

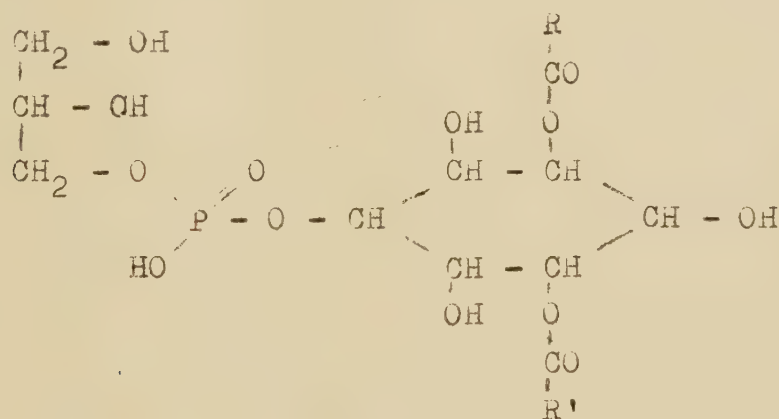
- Si les fonctions alcool du glycérol sont libres, les deux acides gras estérifient alors deux des fonctions alcool de l'inositol. L'inositol reste attaquable par l'acide périodique sauf si les acides gras sont en position méta l'un par rapport à l'autre et aussi par rapport à la fonction ester phosphorique de l'inositol. Dans ce cas, le glycérol devient lui-même oxydable et il n'est pas possible de le retrouver dans les produits d'hydrolyse après l'oxydation.

Si, par contre, l'acide phosphorique estérifie la fonction alcool - β du glycérol, celui-ci ne peut être oxydé par l'acide périodique quel que soit l'emplacement des acides gras dans la molécule. Dans ce cas, l'oxydation périodique telle que nous l'avons envisagée ne peut nous apporter aucune indication sauf, si les deux acides gras estérifient deux fonctions

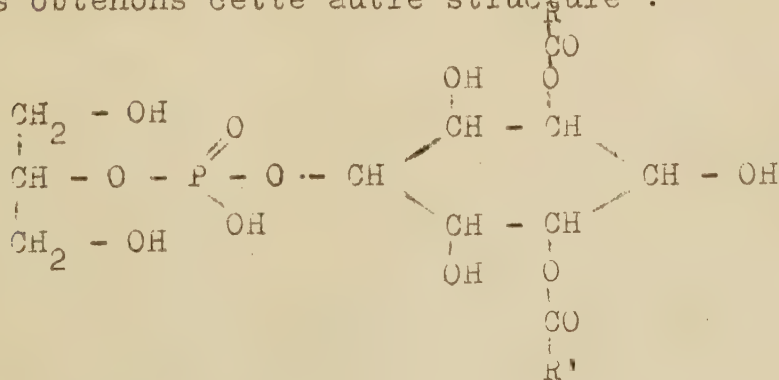
alcool de l'inositol situées en position méta, l'une par rapport à l'autre, et aussi par rapport à la fonction ester phosphorique ce qui protège l'inositol de l'oxydation et il est alors possible de retrouver, à la fois, dans les produits d'hydrolyse, le glycérol et l'inositol intacts. Ce dernier résultat permettrait de fixer avec précision la position des acides gras.

En résumé :

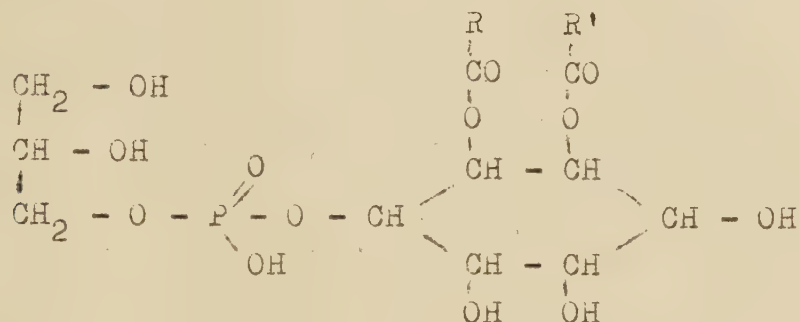
a) Si on ne retrouve que l'inositol (le glycérol étant oxydé) nous pouvons attribuer à l'acide glycéro-inosito-phosphatidique la structure suivante :



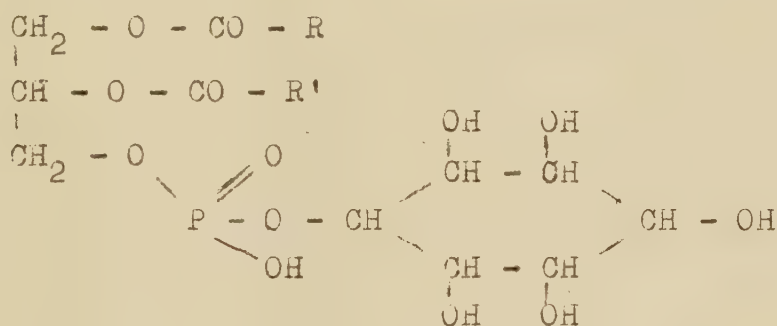
b) Si on retrouve, à la fois, le glycérol et l'inositol, nous obtenons cette autre structure :



c) Si on ne retrouve ni glycérol ni inositol (les deux polyols étant oxydés), plusieurs structures peuvent être proposées, par exemple, celle-ci :



d) Et si, enfin, on ne retrouve que du glycérol (l'inositol étant oxydé) plusieurs structures sont également possibles, notamment, celle qui est analogue à la structure des autres phosphatides naturels connus :



Dans ce travail, nous avons seulement déterminé si le glycérol et l'inositol pouvaient être oxydés par l'acide périodique dans la molécule entière du phosphatide. Autrement dit, après action de l'acide périodique sur le phosphatide, nous avons recherché s'il était possible ou non de retrouver le glycérol et l'inositol dans les produits d'hydrolyse; nous n'avons pas tenté de doser l'acide formique formé au cours de l'oxydation.

2°) Oxydation périodique du phosphatide.

Pour réaliser l'oxydation périodique du phosphatide cristallisé du germe de blé, nous nous sommes heurtée à de nombreuses difficultés dues aux caractères de solubilité de ce phosphatide. En effet, ce produit sous sa forme acide n'est pas soluble dans l'eau, il est très peu soluble dans l'alcool méthylique et il est moins soluble encore dans l'alcool éthylique. Or, il n'est possible de réaliser rapidement, à la température du laboratoire, une oxydation périodique suffisante, qu'en milieu aqueux acide. En milieu aqueux neutre ou en milieu alcoolique acide, la vitesse d'oxydation est considérablement diminuée; il faut, alors, prolonger le temps de contact pour que la réaction puisse se produire. Ces dernières modalités n'ont pu être appliquées, ici, car en présence des produits de l'oxydation, les acides gras se détachent très rapidement du reste de la molécule.

Nous avons effectué de nombreux essais afin de déterminer les conditions expérimentales dans lesquelles nous pouvions soumettre le phosphatide à une oxydation périodique sans détacher ses acides gras. Ces conditions ayant été précisées, nous avons dû rechercher le moyen de séparer le phosphatide "oxydé des réactifs introduits.

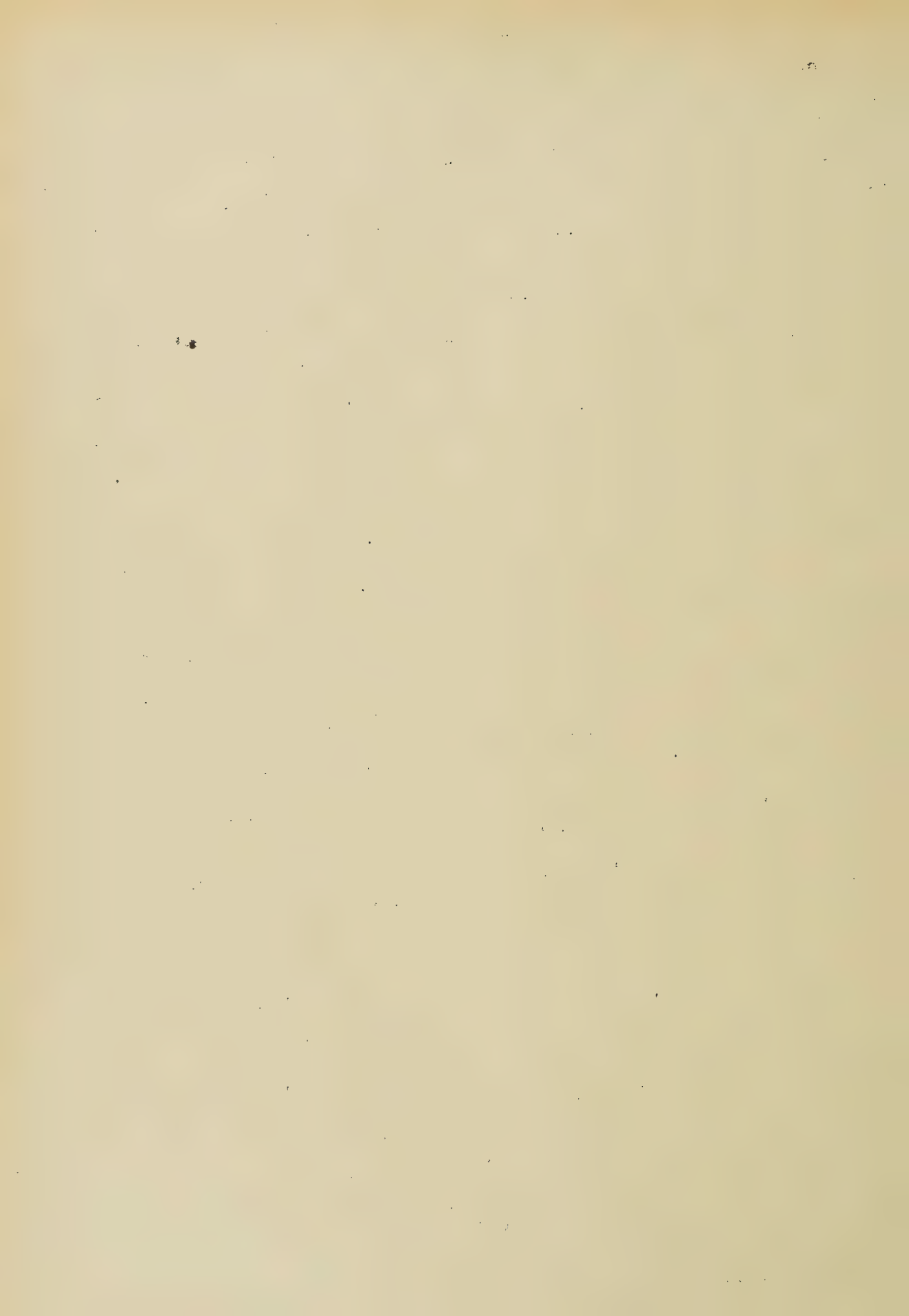
Après plusieurs tentatives, nous avons utilisé le procédé suivant qui nous a donné de bons résultats. (Les précisions techniques sont données dans le tableau IV).

Le phosphatide est converti en acide libre par le procédé habituel. La solution étherée de l'acide est agitée, pendant 1 heure, à la température du laboratoire, avec un égal volume d'une solution aqueuse d'acide periodique N/2 additionnée de 20 p.100 d'alcool méthylique. Il se forme une émulsion d'où l'on extrait le phosphatide "oxydé" avec de l'éther après addition d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (en absence de sel, le phosphatide n'est extrait que partiellement par l'éther). La solution étherée du phosphatide est lavée avec une solution saturée de sulfate d'ammonium, puis elle est déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre.

Le phosphatide "oxydé" est alors soumis à une hydrolyse à deux temps dans les mêmes conditions que celles précisées antérieurement pour le phosphatide initial.

Dans le 1^{er} temps, la solution éthylique chlorhydrique N est chauffée à l'ébullition pendant 1 heure. Après élimination de l'alcool et de l'acide chlorhydrique, les acides gras, libérés sous forme d'esters éthyliques, sont extraits avec de l'éther. La fraction hydrosoluble renferme le phosphore dont la moitié, environ, se trouve sous forme d'acide phosphorique minérale et l'autre moitié sous forme d'ester; elle contient également les polyols non attaqués par l'acide periodique et les produits d'oxydation des polyols : composés aldéhydiques et acides organiques; enfin, on y trouve une petite quantité de sulfate de sodium entraîné au cours des manipulations.

On soumet donc la fraction hydrosoluble au 2^{ème} temps de l'hydrolyse -chauffage à 150° pendant 2 heures - de



T A B L E A U IV

OXYDATION PERIODIQUE

DE L'ACIDE GLYCERO-INOSITO-PHOSPHATIDIQUE

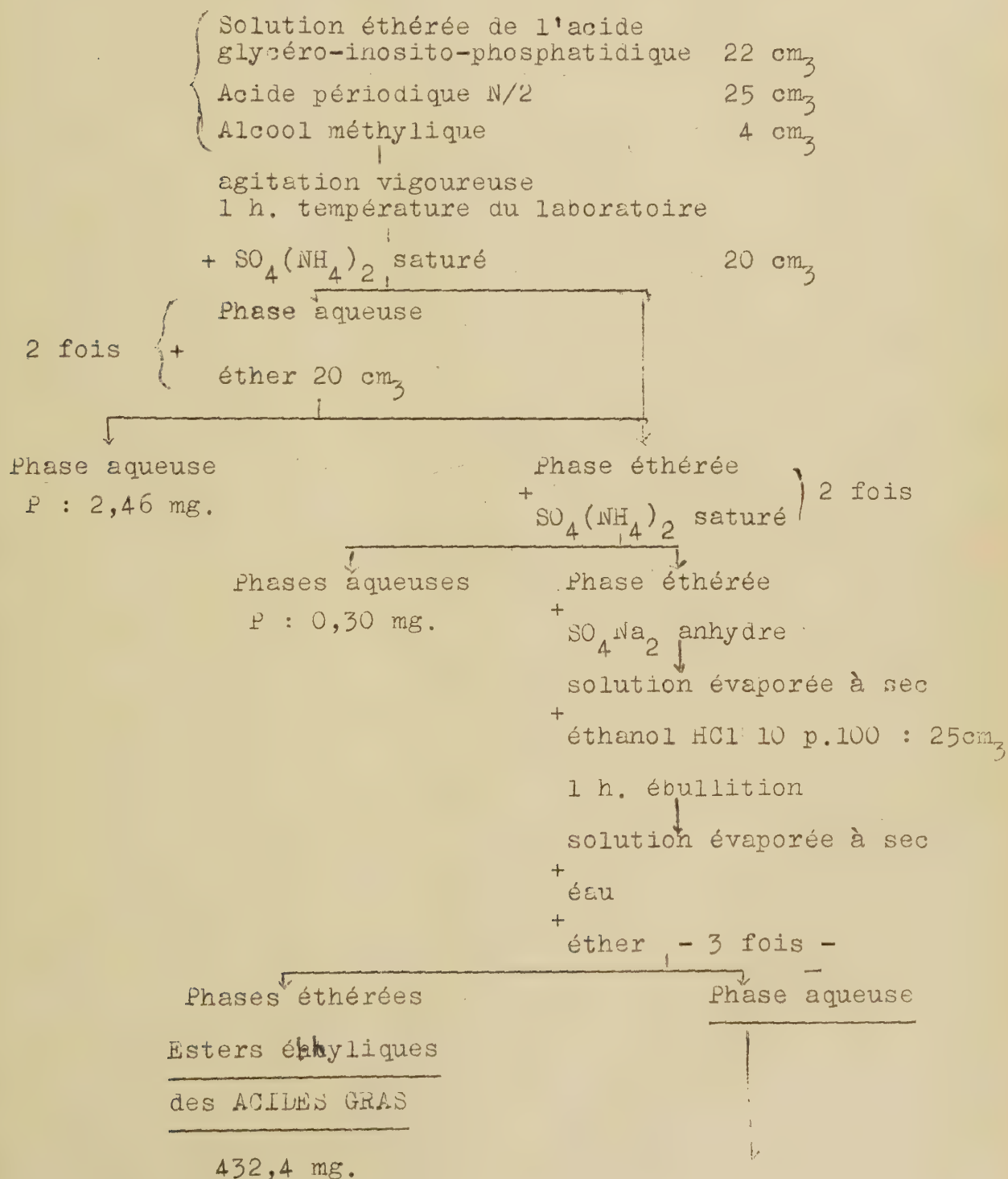


tableau IV (suite)

Phase aqueuse

P total : 20,8 mg.
P minéral : 10,4 mg.

évaporée à sec

+ eau 10 cm₃

chauffage 2h. à 150°

+ sous-acétate de Pb

↓
Précipité

Phosphate Pb
Sulfate Pb

P : 20,46 mg.

↓
Solution

+

SH₂

↓
Précipité

SPb

↓
Solution colorée

- évaporée à sec -

+ eau 5 cm₃

↓
passage à travers

(résine acide R-SO₃H 3cm₃

(résine basique R-NH₂ 3 cm₃

↓
ringage 15 cm₃ eau

↓
solution incolore

- évaporée à sec -

↓
alcool 2 cm₃

3 fois

+
éthér 2 cm₃

↓
Soluble
alcool-éthér

GLYCEROL

62,7 mg.

↓
Insoluble
alcool-éthér

INOSITOL

3,5 mg.

façon à libérer la totalité de l'acide phosphorique. Par addition de sous-acétate de plomb, on précipite l'acide phosphorique et l'ion sulfate. Dans la solution-mère de ce précipité, on élimine l'excès de plomb par un courant d'hydrogène sulfuré. La solution aqueuse renferme alors les polyols non oxydés, les acides organiques, une petite quantité de composés aldéhydiques et un peu d'ion sodium provenant du sulfate de sodium. Afin, d'obtenir une solution de polyols, libre de toute substance contaminante, nous avons ramené le deuxième hydrolysât à un petit volume et nous l'avons fait passer, lentement, à travers une colonne de résine échangeur d'ions constituée par de la résine basique, Amberlite IR-4B, à la partie inférieure, et par de la résine acide, Amberlite IR-100, à la partie supérieure. La résine acide $R-SO_3H$ qui reçoit tout d'abord l'hydrolysât décompose le sel de sodium et retient l'ion sodium, tandis que la résine basique $R-NH_2$, que traverse ensuite la solution, retient les acides libres. Il se produit, en outre, sur cette colonne, une adsorption des substances qui teintaient fortement l'hydrolysât; les polyols du phosphatide initial, par contre, ne sont pas adsorbables par une telle colonne de résine. (nous l'avons vérifié, expérimentalement, tant pour le glycérol que pour l'inositol).

Après cette purification, nous avons évaporé à sec la solution aqueuse de polyols et nous avons fractionné le résidu d'évaporation par un mélange, à parties égales, d'alcool éthylique et d'éther afin de séparer le glycérol, de l'inositol éventuellement présent. La fraction "soluble alcool-

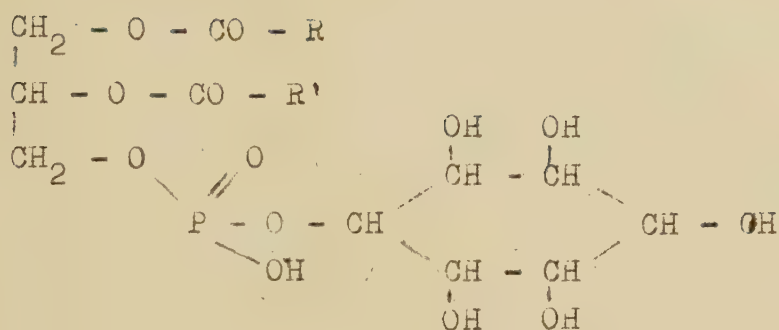
éther" (62,7 mg.) est constituée par du glycérol, que nous avons caractérisé par la réaction de Denigès et la production d'acroléine par déshydratation en présence de sulfate acide de potassium. La fraction "insoluble alcool-éther" est infime (3,5 mg.); en l'examinant au microscope, nous avons constaté qu'elle renferme quelques rares cristaux d'inositol.

Voici les résultats fournis par l'analyse comparative au phosphatide initial et au phosphatide oxydé par l'acide périodique :

	Phosphore	Fraction "soluble alcool-éther" <u>glycérol</u>	Fraction "insoluble alcool-éther" <u>inositol</u>
Phosphatide initial	20,46 mg.	61,2 mg.	122,6 mg.
Phosphatide oxydé par l'acide périodique	20,46 mg.	62,7 mg.	3,5 mg.

Ces résultats montrent que la fraction "glycérol" conserve la même valeur, avant et après oxydation, tandis que la fraction "insoluble alcool-éther" est presque totalement détruite : dans la molécule de glycéro-inosito-phosphatidate de sodium, le glycérol n'est donc pas attaquable par l'acide périodique; seul l'inositol est oxydable par cet acide.

La formule que nous avons proposée pour représenter la structure du glycéro-inosito-phosphatide de sodium du germe de blé semble donc être vraisemblable.



Nous n'avons pas tenté de préciser la position α ou β de l'acide phosphorique qui estérifie le glycérol. Lors de l'hydrolyse des phosphatides, il peut se produire des migrations et la structure α ou β du phosphatide initial peut être différente de celle de l'acide glycéro-phosphorique isolé des produits d'hydrolyse.

R E B U I L D

R E S U M E

Ce travail a pour objet principal l'étude d'un phosphatide isolé du germe de blé et auquel nous avons donné le nom d'acide glycéro-inosito-phosphatidique car sa molécule renferme des acides gras, du glycérol, de l'inositol et de l'acide phosphorique.

Avant d'exposer nos recherches expérimentales, nous avons résumé dans une étude bibliographique nos connaissances actuelles sur les inosito-phosphatides et les acides phosphatidiques

Désirant étudier les acides phosphatidiques du germe de blé, nous nous sommes attachée, tout d'abord, à mettre au point une technique permettant d'extraire et de purifier ces phosphatides, aisément, et avec un bon rendement :

- les germes, tels qu'ils sont livrés par la meunerie, sont extraits par du méthanol à la température du laboratoire.
- les acides phosphatidiques sont précipités de la solution méthylique sous forme de sel de baryum.
- les sels de baryum bruts sont purifiés par dissolution dans de l'éther hydraté et précipitation par du méthanol.
- le traitement des sels de baryum par de l'acide chlorhydrique dilué en présence d'éther, d'eau et de méthanol permet d'obtenir l'ensemble des acides phosphatidiques privés d'impure-

tés non lipidiques.

De l'ensemble des acides phosphatidiques obtenus ci-dessus, on sépare les acides solubles dans l'acétone " S " et les acides insolubles dans l'acétone " I ".

Les acides solubles dans l'acétone " S " sont convertis en sels de baryum que l'on purifie par dissolution dans de l'éther additionné d'une petite quantité d'acide acétique et précipitation par de l'alcool méthylique. On obtient ainsi une quantité importante d'acide glycéro-phosphatidiques privés d'azote, d'ose et d'inositol et possédant sensiblement 2 fonctions acide libres par atome de phosphore.

Les acides insolubles dans l'acétone " I " sont purifiés par précipitation de leur solution étherée par de l'éthanol. Après conversion en sels de baryum, leur solution chloroformique additionnée d'une petite quantité d'acide acétique est précipitée par du méthanol. On obtient un produit phosphoré privé d'azote et d'ose, riche en inositol et possédant moins de 2 fonctions acide libres par atome de phosphore.

La fraction précédente provenant de " I " est dissoute dans un grand volume de méthanol tiède. Il se sépare lentement un produit cristallin que l'on purifie par une deuxième cristallisation dans du méthanol.

Ce phosphatide cristallisé présente les caractéristiques suivantes : $P = 3,55 \text{ p.100}$; $N < 0,03 \text{ p.100}$; oses $< 0,05 \text{ p.100}$; Indice d'iode = 56,4; $F : 130-145^\circ$. Il est soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther anhydre et dans l'éthanol, faiblement soluble dans le méthanol. Il possède une fonction acide libre par atome de phosphore : dans le sel de baryum, le rapport P/Ba est égal à 2.

Pour étudier la constitution de ce phosphatide, nous l'avons soumis à une hydrolyse en deux temps. Dans le premier temps, les acides gras sont libérés sans être altérés; on les sépare alors de la fraction hydrosoluble. Seule la fraction hydrosoluble est soumise au deuxième temps de l'hydrolyse afin de libérer totalement ses constituants.

- le phosphatide cristallisé est privé de sodium et sa solution éthylique $HCl \text{ N}$ est chauffée, à reflux, pendant 1 heure. L'éthanol et l'acide chlorhydrique sont éliminés par évaporation et le produit de l'hydrolyse est divisé en une fraction ~~éthé~~érosoluble et une fraction hydrosoluble.

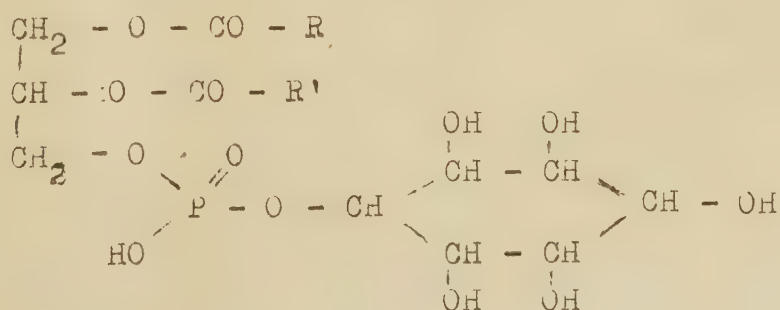
- la fraction éthérosoluble renferme les acides gras (poids : 65 p.100 - insaponifiable : 0 p.100 - poids moléculaire moyen : 278 - Indice d'iode : 95). Par cristallisations à basse température, on sépare des quantités approximativement équimoléculaires d'acide palmitique et d'un mélange d'acides gras non saturés (Indice d'iode : 155).

- la fraction hydrosoluble renferme du glycérol et de l'inositol estérifiés en partie par de l'acide phosphorique. On chauffe la solution aqueuse de cette fraction à 150° pendant

2 heures : l'acide phosphorique, le glycérol et l'inositol sont libérés intégralement. Après élimination de l'acide pnospho-rique sous forme de sel de plomb, le glycérol et l'inositol sont séparés grâce à la solubilité du premier composé dans l'alcool-éther (1 : 1) et à l'insolubilité de la deuxième substance dans ce même solvant.

Les résultats analytiques précédents montrent que la molécule de cet acide glycéro-inosito-phosphatidique est constituée par 1 acide palmitique, 1 acide gras non saturé, 1 glycérol, 1 inositol et 1 acide phosphorique possédant une seule fonction acide libre.

Pour préciser la structure de ce phosphatide, nous l'avons soumis à une oxydation periodique ménagée. Nous sommes parvenus à détruire totalement l'inositol en conservant le glycérol intact. Ce fait plaide en faveur de l'estérification des fonctions alcool du glycérol par les acides gras, et permet de proposer la formule suivante pour représenter l'acide glycéro-inosito-phosphatidique du germe de blé.



BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson (R.J.). - J. Amer. Chem. Soc., 1930, 52 n°1, 1607.
2. Anderson (R.J.), Gilman Roberts. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1930, 27, 387-89.
3. Anderson (R.J.), Gilman Roberts (E.). - J. Biol. Chem., 1930, 89, 599-610.
4. Anderson (R.J.), Gilman Roberts (E.). - J. Biol. Chem., 1930, 89, 611-17
5. Anderson (R.J.), Mary c. Pangborn. - J. Biol. Chem., 1931, 92, XXXii.
6. Burmaster (C.F.). - J. Biol. Chem., 1946, 165, 577-83.
7. Channon (H.J.), Foster (C.A.M.). - Biochem. J., 1934, 28, 853-64.
8. Chibnall (A.C.), Channon (H.I.). - Biochem. J., 1927, 21 n°1, 225; 1927, 21 n°2, 479; 1929, 23 n°1, 168.
9. Courtois (J.). - Exposés annuels de Biochimie médicale - Polonovski -, Masson édit., Paris, 1948, IX, p. 225-76.
10. Faure (M.). - Thèse sciences, Paris, 1940.
11. Faure (M.). - Techniques de laboratoire - Loiseleur -, Masson édit., Paris, 1954, p. 751 et 757.
12. Faure (M.), Coulon (M.J.). - Bull. Soc. Chim. Biol., 1948, 30, 533-38.
13. Faure (M.), Coulon-Morelec (M.J.). - C. R. Acad. Sc., Paris, 1954, 238, 411-12.
14. Faure (M.), Coulon-Morelec (M.J.). - Non publié.
15. Fiske (C.H.), Subbarow (Y.). - J. Biol. Chem., 1926, 66, 375.
16. Fleury (P.), Balatre (P.). - Les Inositols, Chimie et Biochimie, Masson édit., Paris, 1947.

17. Folch (J.), Woolley (D.W.). - J. Biol. Chem., 1942, 142, 963-4.
18. Folch (J.). - J. Biol. Chem., 1942, 146, 35-44.
19. Folch (J.). - Fed. Proc., 1947, 6, 252.
20. Folch (J.). - J. Biol. Chem., 1949, 177 n°2, 497-504 et 505-19.
21. Hanahan (D.J.), Chaikoff (I.L.). - J. Biol. Chem., 1947, 169, 699; 1948, 172, 191-198.
22. Hawthorne (J.N.), Chargaff (E.). - J. Biol. Chem., 1954, 206, n°1, 27-37.
23. Hutt, Malkin, Poole, Watt. - Nature, 1950, 165, 314-15.
24. Kjeldahl. - Zeitsch. anal. Chem., 1883, 22, 366.
25. Klenk (E.), Sakai (R.). - Z. Physiol. Chem., 1939, 258, 33-38.
26. Mc Guire, Earle. - J. Am. Oil Chemist's Soc., 1951, 28, 328-31.
27. Mc Kibbin (J.M.), Taylor (W.E.). - J. Biol. Chem., 1952, 196, n°1, 427-36.
28. Macpherson (L.B.), Lucas (C.C.). - Fed. Proc., 1947, 6, 273.
29. Malkin (T.), Poole (A.G.). - J. Chem. Soc. G.B., 1953, 4, 3470-8.
30. Olcott (H.S.). - Science, 1944, 100, 226-7.
31. Pangborn (M.C.). - J. Biol. Chem., 1942, 143, 247; 1941, 137, 545.
32. Scholfield (C.R.), Dutton (H.J.), Tanner (F.W.), Cowan (J. C.). - J. Am. Oil Chemist's Soc., 1948, 25, 368-72.

33. Scholfield (C.R.), Mc Guire (T.A.), Dutton (H.J.). - J. Am. Oil Chemist's Soc., 1950, 27, 352-5.
34. Smith (J.A.B.), Chibnall (A.C.). - Biochem. J., 1932, 26, 1345.
35. Uroma (E.), Tuomioja (M.). - Ann. med. Exper. Biol. Fenn., 1950, 28 n°1, 72-3.
36. Uroma (E.), Louhivuori. - Ann. med. Exper. Biol. Fenn., 1951, 29, 227.
37. Woolley (D.W.). - J. Biol. Chem., 1943, 147, 581-91.

